THESIS

MUNICH

1967

VERSUCHE ZUR GEWINNUNG FREIER INFEKTIÖSER GENE AUS DEM BAKTERIOPHAGEN T_2

Helmut Zander

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Professor Dr. A. Butenandt

Versuche zur Gewinnung freier infektiöser Gene aus dem Bakteriophagen T_2

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt
von
Helmut Zander
aus
Solingen

1967

issertations-Druckerei Charlotte Schön, München 23, Belgradstr. 11, Tel. 3614

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. P.H.Hofschneider
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. A. Butenandt
Dekan:	Prof. Dr. Manfred Kiese
Tag der mündl. Prüfung:	24.1.1967

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1961 bis Januar 1964 am Max-Planck-Institut für Biochemie in München unter der Leitung von Prof. Dr. A. Butenandt und Privatdozent Dr. P.H. Hofschneider durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Butenandt bin ich sehr dankbar für die Erfüllung meines Wunsches, auf dem Gebiet der molekularen Genetik arbeiten zu dürfen, und für stete Förderung der vorliegenden Arbeit. Herrn Privatdozent Dr. P.H. Hofschneider danke ich für die spezielle Aufgabenstellung, für Unterweisung in experimentell-wissenschaftlichem Arbeiten und kritische Durchsicht des Manuskriptes und Herrn Dr. R. Benzinger für zahlreiche anregende Gespräche.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153513_0010

Inhaltsübersicht

	Seite
1. Einführung und Aufgabenstellung	1
2. Abkürzungsverzeichnis	4
3. Kurze Beschreibung des Bakteriophagen T_2	6
4. Überblick über das experimentelle System	10
41. Die DNS-Präparation	10
42. Die Infektion der Bakterien durch freie DNS	10
43. Die Nachweissysteme	11
5. Material und allgemeine Methoden	14
51. Material	14
52. Allgemeine Methoden	18
6. Spezielle Methoden und Ergebnisse	21
61. Vorarbeiten und Diskussion ihrer Ergebnisse	21
62. DNS-Infektionsversuche	38
621. Versuche mit positiven Ergebnissen	38
6211. Übersicht über die Versuchsanordnung	38
6212. Detaillierte Daten zweier repräsentativer Experimente	39
6213. Zusammenstellung der Resultate der positiven Experimente	41
622. Versuche zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit	48
623. Andere Versuchsanordnungen	54
624. Gesamtzahl der durchgeführten Versuche	56

Seite

7. Diskussion 56

71. Diskussion der Versuche mit positiven Ergebnissen 56

72. Diskussion der geringen Ausbeute und der schwierigen Reproduzierbarkeit 59

721. Prinzipielle Besonderheiten des experimentellen Systems 59

722. Technische Probleme 63

8. Zusammenfassung 67

Literaturverzeichnis 69

Lebenslauf

1. Einführung und Aufgabenstellung

Zu den interessantesten Fragen der Biologie zählt die nach der physikalischen und chemischen Grundlage, auf der genetische Information verschlüsselt, verwirklicht, vervielfältigt und abgewandelt wird. Versuche, dieses Problem unmittelbar an komplex gebauten und komplex funktionierenden höheren Organismen aufzuklären, stoßen auf erhebliche Schwierigkeiten. Aussichtsreicher kann der mittelbare Weg sein, zunächst bei einfacheren Objekten Methoden zu entwickeln und Erkenntnisse zu gewinnen und zu hoffen, daß diese Methoden und Erkenntnisse von heuristischem Wert für das Verständnis genetischer Phänomene bei höheren Organisationsstufen sind.

Sehr einfach strukturierte und methodisch sehr leicht zugängliche Genome fand man in den Viren. Unter diesem Aspekt ist die Virusforschung über ihre ursprüngliche medizinische Relevanz hinausgewachsen und zu einem Gebiet von grundlegender Bedeutung für die allgemeine Biologie geworden.

Im Jahre 1956 zeigten Fraenkel-Conrat (26) sowie Gierer und Schramm (32,33) erstmals am Beispiel des Tabakmosaikvirus, daß nicht das Gesamtvirus notwendig kleinste infektiöse Einheit ist, sondern daß eine definierte Substruktur - die ihres Hullproteins entkleidete, freie Nukleinsäure des Virus - ebenfalls in die Wirtszelle einzudringen, dort die virustypischen Veränderungen hervorzurufen und die Synthese des Gesamtvirus zu induzieren vermag. Ein freies Genom oder, chemisch formuliert, eine freie Nukleinsäure verhält sich hier infektiös.

Seitdem wurden zahlreiche weitere infektiöse Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren beschrieben. Zusammenstellungen finden sich u. a. bei Kozloff (55), Colter et al. (15), Herriot (35). Der Grund für das lebhafte Interesse an infektiösen Nuklein-

säuren war ursprünglich der Nachweis, daß - bei den betreffenden Viren - ausschließlich Nukleinsäuren und nicht auch andere Strukturen als Träger der genetischen Information fungieren. Methodisch wichtiger sind die grundsätzlich neuen Versuchsansätze, welche die infektiösen Nukleinsäuren der experimentellen Biologie ermöglichen. Auch für die medizinische Forschung haben sich bereits einige bemerkenswerte Überlegungen ergeben (35,84).

Bei Fragestellungen der biologischen Grundlagenforschung werden die Vorteile, welche das Arbeiten mit infektiösen Nukleinsäuren bietet, häufig mit den Vorteilen eines Bakteriophagen - Bakterien - Systems vereinigt.

Bakteriophagen, auch Phagen genannt, sind Viren, die spezifisch Bakterien als Wirtszellen infizieren. Sie sind leichter in hohen Konzentrationen zu gewinnen und einfacher quantitativ zu bestimmen als tier- und pflanzenpathogene Viren. Für ihre Wirtszellen, die Bakterien, gilt dasselbe im Vergleich zu Tier- und Pflanzenzellen. Zudem ist ein Wachstumszyklus bei Phagen wesentlich kürzer als bei anderen Viren, was Experimente in rascher Folge ermöglicht.(1,12,37,51,83).

Der erste Phage, aus dem freie Nukleinsäure in infektiöser Form gewonnen werden konnte, war der Phage ØX174 (43,94,34,77). ØX174 enthält als genetische Trägersubstanz eine nicht der Watson-Crick-Struktur entsprechende, einstrangige DNS (78,79). Da jedoch bei den meisten aller Organismen doppelsträngige DNS materielles Substrat von Erbanlagen ist, fehlt ein wichtiges Bindeglied, um Ergebnisse beim Phagen ØX174 als Modellvorstellungen auf höhere Organismen zu übertragen.

Aus diesem Grunde erscheint die Isolierung einer infektiösen Nukleinsäure aus einem Phagen mit doppelsträngiger, der Watson-Crick-Struktur entsprechender DNS wünschenswert. Es muß für den weiteren Gang der Untersuchungen vorteilhaft sein, hierzu einen der biochemisch und genetisch bestuntersuchten Phagen heranzuziehen. Zu diesen gehört der Bakteriophage T_2.

Die Beobachtung von Hershey und Chase (36), daß bei Bakterieninfektion durch T_2-Phagen ganz überwiegend Phagen-DNS (markiert mit P^{32}) und kaum Phagenprotein (markiert mit S^{35}) ins Bakterium eindringen, läßt die Gewinnung einer infektiösen T_2-DNS möglich erscheinen. Zahlreiche experimentelle Bemühungen (28,81,76,62,41,65,45,47) führten zwar zum Teil zu infektiösen Substrukturen, jedoch waren T_2-Abbauprodukte auf der Stufe der freien Desoxyribonukleinsäure in bisher keinem Falle infektiös.

Die Ursache für dieses Scheitern sahen wir in der außergewöhnlichen Größe des T_2-DNS-Moleküls. Das Molekulargewicht eines T_2-DNS-Moleküls liegt zwischen 1,0 und 1,6 x 10^8 (71, 17,53,11); seine Länge beträgt nach elektronenmikroskopischen (53) und autoradiographischen (14) Messungen etwa 50 µ. Vergleichsweise hat infektiöse ØX174-DNS ein Molekulargewicht von 1,7 x 10^6 (79) und eine elektronenmikroskopisch bestimmte mittlere Fadenlänge von 0,1 µ (45).

Ein DNS-Molekül derartiger Länge ist äußerst empfindlich gegenüber hydrodynamischen Scherkräften (16,58); rund 10^{-3} dyn reichen zu seiner Zerstörung aus (58). Unter diesen Gegebenheiten erschien uns die Präparation von biologisch intakten T_2-DNS-Molekülen in ausreichenden Mengen fraglich. Und selbst wenn diese, wie inzwischen bekannt wurde, unter bestimmten Bedingungen möglich ist (40,11), wäre schwer vorstellbar, auf welche Weise ein 50 µ langes Fadenmolekul ohne Hilfe eines Einschleusungsapparates, wie ihn der Phage besitzt, in ein vergleichsweise nur 5 µ langes Wirtsbakterium vollständig eindringen sollte.

Aussichtsreicher könnten Versuche sein, statt eines kompletten T_2-DNS-Moleküls die DNS-Äquivalente einzelner T_2-Gene in freier infektiöser Form zu gewinnen. Über solche Versuche wird in der vorliegenden Arbeit berichtet.

2. Abkürzungsverzeichnis

Ø	: Zeichen für den griechischen Buchstaben "phi" in der Bezeichnung für den Phagen ØX174
A	: Adenin
ATP	: Adenosintriphosphat
B	: E. coli B
B als Index	: Indikatorbakterien, s.S. 19, bsp. E. coli B_B
B/2	: E. coli B/2
Bakt	: Bakterien
B/B	: E. coli B/B
BV-Lösung	: Borat-Versen-Lösung, s.S. 17
dest.	: destillata, destilliert
DNase	: Desoxyribonuclease
DNS	: Desoxyribonucleinsäure
E. coli	: Escherichia coli
EDTA	: Äthylendiamintetraessigsäure, Versen
f. L.	: fast Lyse
G	: Guanin
h	: Stunde(n)
h, h^+	: Eigenschaften des Phagen T_2, s.S. 9
H1, H2	: Bestimmte Harnstofflösungen, s.S. 24
HMC	: 5-Hydroxymethylcytosin
HT2	: Harnstoff-denaturierte T_2-Partikel
inf. ST als Index	: helferinfizierte und in Saccharose-Tris-Puffer gewaschene Bakterien, bsp. E. coli $B_{inf.ST}$
K12	: E. coli K12
K12(λ)/λ	: E. coli K12(λ)/λ
L.	: Lyse
L	: in der Verbindung $T_2Lr^+h^+o$ und T_2Lrh usf.s.S.14
leu	: Leucin
LS als Index	: Lysozym-Sphaeroplasten, bsp. E. coli B_{LS}
Med.	: Medium
o	: Eigenschaft des Phagen T_2, s.S. 14

Ph	: Phage(n)
Pl.	: Plaque(s)
PS als Index	: Penicillin-Sphaeroplasten, bsp. E. coli B_{PS}
r, r^+	: Eigenschaften des Phagen T_2, s.S. 8-9
r_s	: Eigenschaft des Phagen T_2, s.S. 14 u. 21
RA	: Rinderalbumin
RNS	: Ribonukleinsäure
ST-Puffer	: Saccharose-Tris-Puffer, s.S. 17
ST-Wäsche	: Saccharose-Tris-Wäsche, s.S. 19
ST-Bakterien, ST-Zellen	: einer ST-Wäsche unterzogene Bakterien oder Zellen
ST als Index	: ST-Zellen oder ST-Bakterien, bsp. E. coli B_{ST}
T	: Thymin
t, Δt	: Zeit, Zeitdifferenz
thia	: Thiamin, Vitamin B1
threo	: Threonin
Tris	: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	: Umdrehungen pro Minute
UV	: Ultraviolett
UVT_2	: UV-bestrahlte T_2-Partikel
Versen	: = EDTA, Äthylendiamintetraessigsäure
Vol.	: Volumen
W3110(λ)/λ	: E. coli W3110(λ)/λ

3. Kurze Beschreibung des Bakteriophagen T_2

Der Bakteriophage T_2 wurde im Jahre 1945 von Demerec und Fano isoliert (18). Er ist nahe verwandt mit den Phagen T_4 und T_6. Seine Wirtszelle ist Escherichia coli.

Im Plaquetest bildet er nach zwölfstündiger Bebrütungszeit bei 37°C deutlich sichtbare Plaques, deren Durchmesser je nach Nährbodenbedingungen und Colitypen zwischen 0,5 und 2 mm schwankt (1).

Im Elektronenmikroskop gliedert er sich in Kopf und Schwanz. Der Kopf hat die Form eines bipyramidal abgeschlossenen hexagonalen Prismas und enthält in einer Proteinhülle die Phagennukleinsäure. Der Schwanz besteht aus Protein und gliedert sich in einen Schwanzschaft und eine hexagonale Basisplatte mit sechs kurzen, fast rechtwinklig abgespreizten Fortsätzen und vier bis sechs Schwanzfibern. Der Schwanzschaft besteht aus zwei ineinandergeschobenen Hohlzylindern, deren äußerer sich kontrahieren kann. Über die Größenmaße orientiert die Abbildung 1.(1,83,52,8).

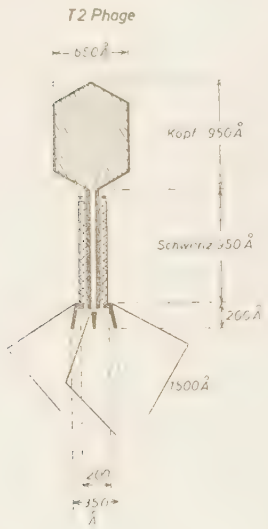

Abb. 1 Skizze des Phagen T_2 nach E. Kellenberger (52)

Das Partikelgewicht beträgt 5×10^{-16} g. Davon entfallen 2×10^{-16} g = 40% auf Desoxyribonukleinsäure und nicht ganz 60% auf Protein. Als Spurenstoffe kommen im Phagenkopf die Polyamine Spermidin und Putrescin, ein Polypeptid und ein inneres, von den äußeren Hullproteinen unterschiedenes Protein vor. Im Phagenschwanz

wurden Lysozym und ATP nachgewiesen. Die DNS des Phagen enthält an Stelle des Cytosins glucosyliertes 5-Hydroxymethylcytosin. Sie hat eine Schwimmdichte von 1,700 in Caesiumchlorid und ein molares Basenverhältnis (A+T)/(G+HMC) von 65/35. RNS enthält der Phage nicht.(1,55,52,12,80).

Nach neueren Ergebnissen besteht die DNS des Phagen aus einem einzigen Molekül mit einem Molekulargewicht von 1,0 - 1,6 x 10^8 (40,71,17,53,14). Die Länge des DNS-Fadens wurde elektronenmikroskopisch (53) und autoradiographisch (14) zu etwa 50 µ bestimmt. In Einklang mit diesen biochemisch-morphologischen Ergebnissen steht der genetische Befund, daß alle Erbmerkmale des Phagen T_2 eine einzige Kopplungsgruppe bilden (75, 85). Diese Erbmerkmale sind auf der Genkarte kreisförmig angeordnet (87). Ob dem genetischen Kreis materiell ein endloses Ringmolekül oder eine Population zirkulär permutierter, endlicher Fadenmoleküle entspricht (86), ist noch nicht entschieden. Die von Thomas et al. (88) vorgelegte Evidenz, daß mittels Phenol freipräparierte T_2-DNS einen endlichen, zirkulär permutierten Faden bildet, kann entweder die natürlichen Verhältnisse widerspiegeln oder durch artifizielles, statistisch verteiltes Zerbrechen eines Ringmoleküls erklärt werden.

Der Phage verfügt über einen Penetrationsapparat zur aktiven Durchbohrung der Zellwand. Bei der Infektion eines Wirtsbakteriums lassen sich drei Hauptphasen unterscheiden (1,83,52):

1) Die reversible Adsorption: Der Phage heftet sich mit Schwanzfibern und Basisplatte an spezifische Rezeptorstrukturen der Bakterienwand an.
2) Die irreversible Penetration: Der äußere Schwanzschaft wird kontrahiert, das Phagenlysozym freigesetzt und der innere, hohle Schwanzstift durchbohrt die Bakterienwand.
3) Die Invasion oder "Injektion": Die Phagennukleinsäure dringt zusammen mit den Spurenstoffen des Phagenkopfes in den Bakterienleib ein. Die leeren Proteinhüllen bleiben außen zurück.

Auf die Infektion folgen morphologische Desorganisation und chemische Depolymerisation von Wirtsnukleinsäuren sowie Neusynthese von phagenspezifischen Proteinen und Nukleinsäuren. Bei einer Temperatur von 37°C treten 2 Minuten nach der Infektion das erste phagenspezifische Frühprotein, nach 6 Minuten die erste HMC-haltige DNS (= Phagen-DNS), nach 8 Minuten das erste Kopfprotein, nach 10 Minuten die ersten schwanzlosen Phagenköpfe und nach 12 Minuten die ersten reifen Phagen auf. Nach etwa 15 bis 20 Minuten erfolgt die Lyse des Bakteriums, d. h. die Bakterienwand bricht auf und gibt reife Phagen, Phagenvorstufen, Bakterientrümmer und zahllose Enzyme frei. Unter optimalen Bedingungen beträgt die Wurfgröße rund 100 reife Phagen pro Bakterium.(1,83,12,52)

Aus der Genetik des Bakteriophagen T_2 sind folgende Angaben für das Verständnis der vorliegenden Arbeit wichtig (1,83):

Die Mutante r ist nach dem Kriterium der Lysezeit (r = rapid lysis) und den sich daraus ergebenden Unterschieden in der Plaquemorphologie definiert. T_2r bildet auf E. coli B große Plaques mit trüben Höfen, der Wildtyp T_2r^+ kleine Plaques ohne Höfe. Auf E. coli K12 sind die entsprechenden Plaques kleiner als auf E. coli B. Auf lysogenen Colistämmen wie K12(λ)/λ oder W3110(λ)/λ wächst nur T_2r^+, nicht T_2r ("Benzer-System" (3,4,5)). T_2r-infizierte K12(λ)/λ sterben ab, ohne daß neue Phagen gebildet werden+). Wenn ein K12(λ)/λ -Bakterium mit T_2r^+ und T_2r mischinfiziert ist, wird durch Komplementation T_2r-Bildung ermöglicht.

Die r-Region umfaßt etwa 2% der Genkarte. Ein chemisches oder morphologisches Substrat der Eigenschaft r ist nicht bekannt.

+) Vom nahe verwandten T_4r liegen genauere Untersuchungen vor (31,67). Phagen-DNS- und -Proteinsynthese verlaufen normal in den ersten 10 Minuten nach Infektion und brechen dann abrupt ab. Bei hohen Mg^{++}-Konzentrationen aber schreiten sie bis zur Bildung von reifen Phagen fort (31). Dieser Mg^{++}-Effekt ließ sich bei unseren T_2r nicht beobachten.

Die Mutante h betrifft den Wirtsbereich (h = host range). T_2h vermag E. coli B/2 zu infizieren, das gegenüber dem Wildtyp T_2h^+ adsorptionsresistent ist. T_2h und T_2h^+ unterscheiden sich wahrscheinlich in der chemischen Struktur ihrer Schwanzfibern.

Eine Zusammenstellung des Plaquetest-Verhaltens der möglichen Rekombinanten aus den Phageneigenschaften r^+/r und h^+/h auf verschiedenen Colistämmen gibt die Tabelle 1.

	B	B/2	K12	K12(λ)/λ W3110(λ)/λ
$T_2r^+h^+$	kleine Pl.	-	sehr kleine Pl.	sehr kleine Pl.
T_2rh	große Pl.	große Pl.	kleine Pl.	-
T_2r^+h	kleine Pl.	kleine Pl.	sehr kleine Pl.	sehr kleine Pl.
T_2rh^+	große Pl.	-	kleine Pl.	-

Tab. 1: Zusammenstellung des Verhaltens der Phagen $T_2r^+h^+$, T_2rh, T_2r^+h, T_2rh^+ im Plaquetest mit den Wirtszellen E. coli B, B/2, K12, K12(λ)/λ und W3110(λ)/λ. (Pl.: Plaques; - : keine Plaquebildung)

4. Überblick über das experimentelle System

Es ist die Aufgabe gestellt, DNS-Äquivalente einzelner Gene des Bakteriophagen T_2 in freier infektiöser Form zu gewinnen.

Zur Lösung benötigt man ein experimentelles System, welches folgende drei Voraussetzungen erfüllt:

1) In der DNS-Präparation muß das DNS-Teilstück, welches dem Gen entspricht, genetisch intakt vorhanden sein.

2) Dieses DNS-Teilstück muß in die Bakterienzelle gelangen und dort genetisch wirksam werden.

3) Die genetische Wirksamkeit muß durch ein geeignetes Nachweissystem erfaßt werden können.

41. Die DNS-Präparation

Die DNS wurde im Prinzip mit der Phenolmethode nach Schuster, Schramm und Zillig (73) isoliert. Diese Methode erschien zur Erfüllung der geforderten Voraussetzung geeignet, weil sie in zahlreichen Fällen freie infektiöse Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren geliefert hat (32,33,55,15,35,43,94,34,49,69,90,91, 92,65,24,25,54,46,68).

42. Die Infektion der Bakterien durch freie DNS

Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion von E. coli-Zellen durch DNS steigt nach den Erfahrungen mit ØX174-DNS außerordentlich stark an, wenn die Bakterienzellen einer Vorbehandlung unterzogen werden. So waren beispielsweise bei unbehandelten Bakterien, wie sie als Indikatorbakterien verwendet werden, 10^{13} Phagenäquivalente ØX174-DNS, bei vorbehandelten Bakterien lediglich 10^3 Phagenäquivalente ØX174-DNS zur Erzielung eines infektiösen Zentrums erforderlich (43,45,48). In allen weiteren bisher mitgeteilten Fällen von infektiöser Phagennukleinsäure waren die Wirtszellen nur nach einer geeigneten Vorbehandlung kompetent (13,94,34,77,49,69,65,24,25,54,46,68,90,91,92).

Um für die T_2-DNS-Infektionsversuche der vorliegenden Arbeit kompetente Bakterien zu gewinnen, wurden Vorbehandlungsverfahren unterschiedlichen Typs durchgeführt:

1) Ein Abbau des Mucopolysaccharidanteils der Bakterienwand durch die Mucopolysaccharase Lysozym nach Hofschneider (44,45) oder Sinsheimer (34),

2) eine Aufbauhemmung dieses Bakterienwandanteils durch Penicillin in Anlehnung an Lederberg (56), Liebermeister und Kellenberger (59).

Bei beiden Verfahren nehmen die Bakterien eine kugelige Form an und heißen "Sphaeroplasten"+).

3) Eine osmotische Belastung durch aufeinanderfolgende Wäsche mit destilliertem Wasser und hypertonischem Saccharose-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer im Prinzip nach Hofschneider (45),

4) ein Kälteschock nach Kaiser und Hogness (49).

43. Die Nachweissysteme

Zur Erkennung der eventuellen genetischen Wirksamkeit der infizierenden T_2-DNS wurden zwei Rekombinationssysteme und ein Komplementationssystem entwickelt. Diese Systeme haben gegenüber nichtgenetischen Systemen wie beispielsweise chemischen oder serologischen die Vorzüge höchstmöglicher methodischer Einfachheit und - abgesehen vom Komplementationssystem - höchstmöglicher Nachweisempfindlichkeit.

+) Die in der Literatur zuweilen gebrauchte Bezeichnung "Protoplasten" für Lysozym- oder Penicillin-induzierte Kugelformen gramnegativer Stäbchen ist unkorrekt, da bei der Lysozym- oder Penicillinbehandlung Zellwandbestandteile auf dem Protoplasmaleib zurückbleiben (44,60).

431. Das r^+/r-K12(λ)/λ -Rekombinationssystem+)

Wirtszellen vom Colityp B oder K12 oder K12(λ)/λ wurden in flüssigem Medium mit einer DNS-Präparation aus T_2r^+-Phagen infiziert und mit intakten T_2r-Phagen, sogenannten "Helferphagen", superinfiziert. Eine genetische Wirksamkeit der T_2r^+-DNS ist nachgewiesen, wenn sie mit dem intakten T_2r-Helfergenom rekombiniert und in der Phagennachkommenschaft intakte T_2r^+-Phagen gefunden werden. Nach solchen wurde im Plaquetest mit Hilfe der Indikatorbakterien E. coli K12(λ)/λ selektiv gesucht.

432. Das h/h^+-B/2-Rekombinationssystem+)

Wirtszellen vom Colityp B wurden in flüssigem Medium mit einer DNS-Präparation aus T_2h-Phagen infiziert und mit intakten T_2h^+-Helferphagen superinfiziert. Eine genetische Wirksamkeit der T_2h-DNS ist nachgewiesen, wenn sie mit dem intakten T_2h^+-Helfergenom rekombiniert und in der Phagennachkommenschaft intakte T_2h-Phagen gefunden werden. Nach solchen wurde im Plaquetest mit Hilfe von E. coli B/2 als selektivem Indikatorbakterium gesucht.

433. Das r^+/r-K12(λ)/λ -B-Komplementationssystem+)

Wirtszellen vom Colityp K12(λ)/λ wurden in flüssigem Medium mit einer DNS-Präparation aus T_2r^+-Phagen infiziert und mit intakten T_2r-Helferphagen superinfiziert. Eine genetische Wirksamkeit der T_2r^+-DNS ist nachgewiesen, wenn sie die Reifung der T_2r-Phagen, die in K12(λ)/λ nur bei T_2r^+/T_2r-Mischinfektionen möglich ist, durch Komplementation zuläßt und Nachkommen der T_2r-Helferphagen entstehen. Da die gesuchten T_2r-Nachkommenphagen von den superinfizierenden T_2r-Helferphagen biologisch nicht zu unterscheiden sind, schied die Möglichkeit der Verwendung eines selektiven Indikators prinzipiell aus. Es wurde stattdessen mit E. coli B plattiert und geprüft, ob im Ansatz mit T_2r^+-DNS ein signifikant höherer T_2r-Titer als im Kontrollansatz ohne T_2r^+-DNS vorlag.

+) Vgl. Abschnitt 3., Kurze Beschreibung des Bakteriophagen T_2, Absatz Genetik S. 8 und Tabelle 1 S. 9.

Die genannten selektiven Indikatormethoden arbeiten äußerst empfindlich. K12(λ)/λ mißt die genetische Konfiguration r^+ bis zu einer r^+/r-Rate von $\sim 10^{-9}$. B/2 mißt den Adsorptionstyp h bis zu einer h/h^+-Rate von $< 10^{-9}$. Praktisch bedeutete dies, daß auf nur einer Agarplatte einzelne wenige Phagen der gesuchten Konfiguration unter rund 10^9 anderen Phagen, die bei der Fragestellung nicht interessierten, auf einen Blick an ihrer Plaquebildung erkannt werden konnten.

Die Mehrzahl der Experimente wurde mit dem Rekombinationssystem r^+-DNS x r-Helferphage (431.) durchgeführt. Das Komplementationssystem (133.) hat wegen fehlender Selektivität den Nachteil einer geringen Nachweisempfindlichkeit, das Rekombinationssystem h-DNS x h^+-Helferphage (132.) wegen des möglichen Auftretens von geno-phänotypischen Mischformen+) den Nachteil einer erschwerten quantitativen Auswertung. Das r^+/r-Rekombinationssystem und das Komplementationssystem wurden zuweilen in einem Experiment kombiniert, indem

a) zur Infektion K12(λ)/λ herangezogen wurde und
b) bei der Untersuchung der Nachkommenschaft die eine Hälfte des Ansatzes mit K12(λ)/λ -Indikatorbakterien selektiv auf Rekombination und die andere Hälfte mit B-Indikatorbakterien quantitativ auf Komplementation untersucht wurden.

Die Inkubation der infizierten Wirtszellen wurde in flüssigem Medium bei 37°C über kurze oder längere Zeit durchgeführt. Nach kurzer Inkubation (5 bis 15 min) wurde im nachfolgenden Plaquetest die Zahl der DNS-Infektionszentren, nach längerer Inkubation (30 min bis zu mehreren Stunden) die Zahl

---

+) Wachsen beispielsweise die Phagen T_2h und T_2h^+ in demselben Bakterium, so wird bei der Phagenreifung ein Teil der h-Genome in h^+-Proteine verpackt und umgekehrt ("phenotypic mixing" (1)). Im vorliegenden Falle (selektiver Inkator B/2) könnte ein Phage vom Genotyp h^+ und vom Adsorptionstyp h zwar keinen Plaque bilden, aber andererseits müßten sich diejenigen Phagen des gesuchten Genotyps h dem Nachweis entziehen, die dem Adsorptionstyp h^+ zugehören.

der von diesen Zentren inzwischen produzierten Phagen gemessen. Der Ablauf eines oder mehrerer Vermehrungszyklen ist als "Verstärkereffekt" zum Nachweis infektiöser DNS zunächst wünschenswert.

5. Material und allgemeine Methoden

51. Material

Bakterienstämme:

Escherichia coli B, B/2, B/B, B/1, K12, K12(λ)/λ, W3110(λ)/λ aus der Sammlung des Max-Planck-Instituts für Biochemie, München. E. coli K12 C 600 threo$^-$ leu$^-$ thia$^-$ (λ)$^-$ aus der Sammlung des Laboratoire de Biophysique, Universität Genf.

Phagenstöcke:

$T_2Lr^+h^+o$: von Müller-Jensen (66) isolierte osmotisch resistente Mutante des $T_2Lr^+h^+$ der Sammlung des Laboratoire de Biophysique, Universität Genf; im Text je nach Zusammenhang kurz als $T_2r^+h^+$ oder T_2r^+, T_2h^+ bezeichnet.

T_2Lrh: aus der Sammlung des Laboratoire de Biophysique, Universität Genf; im Text je nach Zusammenhang als T_2Lrh oder kurz als T_2Lr oder T_2Lh, T_2rh, T_2r, T_2h bezeichnet.

T_2r_sh: selbst isolierte, genetisch stabilere Mutante des T_2Lrh^+)[+]; im Text je nach Zusammenhang als T_2r_sh oder kurz als T_2rh oder T_2r, T_2h bezeichnet.

+) vgl. Abschnitt 611., S. 21

Spezialpräparate:

Pepton: "Peptonum e carne siccum",
"Peptonum e caseino siccum"
E. Merck AG., Darmstadt

Nutrient Broth, Vitaminfree Casamino Acids, Bacto

Agar: Difco Laboratories, Detroit 1, Michigan

Rinderalbumin: Hyland Laboratories, Los Angeles, Calif.;
Povite-Poviet-Producten N. Y., Amsterdam

L-Threonin: Biochemica "Roche", Dt. Hoffmann-LaRoche AG., Grenzach/Baden

L-Leucinum: E. Merck AG., Darmstadt

Thiamin-hydrochlorid "Roche": Dt. Hoffmann-LaRoche AG., Grenzach/Baden

Chloramphenicol: "Chloromycetin-Substanz"; Parke, Davis u. Co., München

Penicillin: " Penicillin G "Hoechst" krist. Natr. Salz "; Farbwerke Hoechst AG., Frankfurt/Main

Lysozym: "Lysozyme 3x crystallised", Sigma Chemical Company, St. Louis 18, Missouri

ØX174-DNS: freundlich überlassen von Herrn Dr. Benzinger, Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Feste Medien:

Standard-Agar:

Boden-Agar: 1,5% Deutscher Agar; 1,0% Pepton, 0,5% NaCl. Nach Sterilisation 6 ml 1n NaOH/Liter

Soft-Agar: 1% Deutscher Agar; 1% Pepton; 0,5% NaCl

Spezialagar für T_2 auf K12(λ)/λ und K12:

Boden-Agar: 1,1% Bacto Agar Difco; 1,0% Pepton; 0,4% NaCl

Soft-Agar: 0,7% Bacto Agar Difco; 1,0% Pepton; 0,4% NaCl

Saccharose-Soft-Agar: 0,7% Bacto Agar Difco; 1,0% Pepton; 0,4% NaCl; 13,0% Saccharose (separat sterilisiert); Rinderalbumin nach Angabe (.. % RA)

Flüssige Medien:

Standard-Medium: 1% Pepton; 0,5% NaCl

Broth-Medium: 1,0% Nutrient Broth Difco; 0,5% NaCl

Fraser-Medium: nach (27) in folgender Modifikation: Na_2HPO_4 10,5g; KH_2PO_4 4,5g; NH_4Cl 1,0g; $MgSO_4$ 0,3g; $CaCl_2$ 1 m 0,3 ml; Gelatine 1,0 ml; Nutr. Broth 15g, Glyzerin 25 ml; Glucose 5g; H_2O ad 1 l.

Medium M9: nach einer Vorschrift des Inst. de Biophysique, Univ. Genf: 1 Vol. Salzlösung (7% Na_2HPO_4; 3% KH_2PO_4; 0,5% NaCl; 1% NH_4Cl); 1 Vol. 4% Glucose; 0,1 Vol. 0,01 m $CaCl_2$; 0,1 Vol. 0,1 m $MgSO_4$; 7,8 Vol. aqua dest.

Medium H: nach (49): 0,1 m KH_2PO_4 - K_2HPO_4 - Puffer pH 7,0; 0,015 m $(NH_4)_2SO_4$; 0,001 m $MgSO_4$; 1,8 x 10^{-6} m $FeSO_4$

Medium P: nach (49): wie Medium H jedoch 0,02 m Phosphatpuffer pH 7,0 statt 0,1 m Phosphatpuffer pH 7,0

Medium 3xD: nach (34) in folgender Modifikation: 15g Casamino Acids; 30g Glyzerin; 1 ml 1% Gelatine; 0,3 ml 1 m $CaCl_2$; 0,3g $MgSO_4$; 1g NH_4Cl; 2,1g Na_2HPO_4; 0,9g KH_2PO_4; H_2O ad 1 l

Medium TCG: nach (7): 100 ml 0,1 m Tris pH 7,5; 0,16 ml 1,0 m Na_2SO_4; 0,64 ml 0,1 m KH_2PO_4; 0,10 ml 1,0 m $MgSO_4$; 0,03 ml 0,01 m $FeCl_3$; 0,02 ml 0,5 m $CaCl_2$; 0,20 ml 25% NaCl; 1,0 ml 10% Glucose; 1,0 ml 5% Vitaminfree Casamino Acids.

Medium E: nach (45): 5 ml 2% Nutrient Broth Difco; 1 ml 1m NaCl; 0,5 ml 0,1 m $MgSO_4$; 0,1 ml Tris-Puffer pH 8,5 (pH 7,5); 0..0,66 ml 30% Rinderalbumin, aqua dest. ad 10,0 ml. Rinderalbuminkonzentration jeweils angegeben (0..2% RA)

Medium E^-: Medium E ohne $MgSO_4$

Vitaminfreies Medium E bzw. E^-: statt Nutrient Broth 5 ml 2% Vitaminfree Casamino Acids, sonst wie Medium E bzw. E^-

Minimal-Medium E: statt Nutrient Broth 5 ml Doppel-M9, sonst wie Medium E

Aminosäuren - B1 - M9 - Medium: M9-Medium + 30γ L-Threonin/ml + 30γ L-Leucin/ml + 10γ Thiaminhydrochlorid/ml

Aminosäuren - B1 - Medium E: Medium E + 30γ L-Threonin/ml + 30γ L-Leucin/ml + 10γ Thiaminhydrochlorid/ml

Doppel-Standardmedium, Doppel-Broth, Doppel-Fraser, Doppel-M9: Ingredienzien in jeweils doppelter Konzentration.

Saccharose-Pepton-Medium: 4 Vol. Doppel-Standardmedium; 2 Vol. 1 m Saccharose; 1 Vol.aqua dest.

Saccharose-Fraser-Medium: 2 Vol. Fraser-Medium; 1 Vol. 1 m Saccharose

Lösungen:

Phosphat-Puffer: K - Na - HPO_4 - H_2PO_4 - NaCl - Puffer 0,1 m pH 7,2 nach Sörensen

0,01 m-Phosphat-Puffer: 1:10 in aqua dest. verdünnter 0,1 m Phosphatpuffer

Tris-Puffer: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Salzsäure-puffer 0,1 m pH 7,5 oder pH 8,5

Saccharose-Tris-Puffer (abgekürzt ST-Puffer): 3 Vol. 1 m Saccharose; 3 Vol. Tris-Puffer pH 8,5 (Regelfall) oder pH 7,5; 2 Vol. aqua dest.

Borax-Versen-Lösung (abgekürzt BV-Lösung): bei 1°C gesättigte wässrige Lösung von Natriumtetraborat mit 0,002 m Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA, Versen)

Peroxydfreier Äther: destillierter Diäthyläther über EisenIIsulfat

52. Allgemeine Methoden

Standardmethoden für das Arbeiten mit Bakteriophagen nach Adams (1).

T_2-Bakteriophagenzucht:

E. coli B oder B/B, B/1, B/2, K12, K12(λ)/λ wurden in 10-Liter-Flaschen in der Regel in M9-Medium, zuweilen in Fraser-Medium oder Standard-Medium bei 37°C unter guter Belüftung gezüchtet. Gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von $2..6 \times 10^8$ Bakt/ml wurden sie mit 1..10 Ph/Bakt infiziert und bei 37°C weitere 4..6 Stunden belüftet. Kurz vor dem Aufklaren der Kulturen wurden die Bakterien in einer Durchlaufzentrifuge sedimentiert, der Überstand mit Eisessig auf pH 4 eingestellt und nochmals in die Durchlaufzentrifuge geschickt. Der Gesamtniederschlag enthielt phagengefüllte Bakterien, isoelektrisch bei pH 4 gefällte freie Phagen sowie Bakterientrümmer. Er wurde in Phosphatpuffer aufgenommen, homogenisiert, mit Chloroform+) geschüttelt und, sofern die Viskosität hoch war, mit DNase und $MgSO_4$ (zur Zerstörung von Bakterien-DNS) über Nacht bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die freigesetzten Phagen wurden durch mehrmaliges abwechselndes nieder- und hochtouriges Zentrifugieren (5.000 U/min 10 min, 18.000 U/min 60 min; Servallzentrifuge RC2) von Bakterientrümmern und niedermolekularen Verunreinigungen befreit, auf einen Titer von $10^{11}..10^{13}$ Ph/ml konzentriert und in Phosphatpuffer über Chloroform bei 4°C aufbewahrt.

+) Mit Chloroform läßt sich die Lyse phageninfizierter Bakterien provozieren. Hierbei werden reife intrazelluläre Phagen in Freiheit gesetzt (30,74).

Bakteriophagentiter wurden mit dem Plaquetest in Zweischicht-Agar-Technik bestimmt. Die Vorverdünnungen wurden in Phosphatpuffer durchgeführt. "Über Chloroform verdünnt" bedeutet, daß im ersten Verdünnungsschritt mit Chloroform geschüttelt wurde+).

Bakterientiter wurden, soweit nicht anders angegeben, im Phasenkontrastmikroskop durch Auszählen in einer Thoma-Zählkammer bestimmt.

Als Indikatorbakterien wurden frische 10 ml-Übernachtkulturen oder frisch gesättigte Tageskulturen in Fraser-Medium oder Standard-Medium (Titer ~ 2×10^9 [illegible]/ml) verwendet, zuweilen auch wachsende Kulturen bei [illegible] [illegible]/ml, die zentrifugiert und in 1/10 des Ausgangsvolumens in Standard-Medium aufgenommen worden waren.

Bakterien-Vorbehandlungsverfahren:

Saccharose-Tris-Wäsche	: nach Hofschneider (45)
Lysozym-Sphaeroplastierung	: a) nach Hofschneider (45) b) nach Sinsheimer (34)
Penicillin-Sphaeroplastierung	: in Anlehnung an (56) und (59) in eigenen Modifikationen (vgl. Abschnitt 614., S.25)
Kälteschock	: nach Kaiser und Hogness (49)
HT_2-Partikel	: in Anlehnung an Hofschneider und Müller-Jensen (45,47) in eigenen Modifikationen (vgl. Abschnitt 613., S.22)

Präparation der T_2-Phagen-DNS

Die DNS wurde im Prinzip nach der Phenolmethode von Schuster, Schramm und Zillig (73) präpariert. 5 ml eines gereinigten Phagenkonzentrats von $10^{11}..10^{13}$ Ph/ml wurden gegen 0,1 m NaCl, sodann gegen BV-Lösung dialysiert, anschließend mit 5 ml 80%igem Phenol (80g Phenol + 20 ml BV-Lösung) 3 Minuten geschüttelt. Die wässrige Phase, welche die DNS enthielt, wurde durch Zentrifugation von der Phenolphase abgetrennt.

+) vgl. Fußnote S. 18

Nach diesem Schritt wurden verschiedene Wege beschritten:

1) (Regelfall) Die wässrige Phase (DNS) wurde dreimal mit jeweils gleichem Volumen peroxydfreiem Äther zur Entfernung des wassergelösten Phenols ausgeschüttelt (Beschleunigung der Phasentrennung durch Zentrifugation), der restliche, wassergelöste Äther durch Einblasen von Stickstoff ausgetrieben und die so präparierte DNS
   a) gegen 0,1 m NaCl dialysiert oder
   b) gegen 0,1 m oder 0,01 m Phosphatpuffer dialysiert oder
   c) nicht dialysiert, d.h. im Borat-Versen belassen
   und bei 4°C zur Verwendung aufbewahrt.
2) Da beim Ausschütteln mit Äther sich Peroxyde bildeten (gezeigt durch Nachweis einer Oxydation von EisenIIsulfat mittels KSCN), wurde - um der Gefahr einer oxydativen Zerstörung der DNS vorzubeugen - auf die Ätherschritte verzichtet und das wassergelöste Phenol durch mehrmalige Dialyse gegen 0,1 m Phosphatpuffer entfernt.

Die Raumtemperatur betrug bei allen Schritten 4°C. Zentrifugen, Phenol und Äther waren auf 4°C vorgekühlt. Die erhaltenen DNS-Lösungen waren klar und hochviskös.

DNS-Bestimmungen erfolgten

a) mit Diphenylamin nach Dische (20),
b) durch Abschätzung aus dem biologischen Phagentiter (Phagenzahl mal 2×10^{-16} g). Dieses Verfahren ist sehr grob, da der biologische Phagentiter unter dem elektronenmikroskopischen Titer liegt und die Phagensuspension während der DNS-Präparation eine Volumeneinengung durch Wasserentzug erfährt.

Zerlegung der DNS in Einzelstränge erfolgte durch Hitzedenaturierung im Prinzip nach Doty, Marmur et al. (22): 1 ml einer DNS-Lösung von $\leq 10\gamma$ DNS/ml in 0,05 m oder 0,001 m Phosphatpuffer oder in 0,05 m oder 0,001 m NaCl wurde im Wasserbad auf 100°C erhitzt, 5 min im siedenden Wasserbad belassen und dann in Eiswasser abgekühlt. Hitzedenaturierte DNS wurde in der Regel sofort zu DNS-Infektionsversuchen verwendet.

Die Ultraschallbehandlung der DNS-Lösung erfolgte mit dem "Beschallgerät 10 kHz EO. PE 431 b" der Firma Siemens und Halske bei etwa 2/3 der maximalen Intensität. Die Wirksamkeit der Beschallung wurde an deutlich sichtbarer Viskositätsabnahme erkannt.

UV-Bestrahlungen erfolgten mit einer handelsüblichen Quecksilber-Niederdruckröhre ("Original Hanau NN 30/89") der Firma Quarzlampen GmbH, Hanau.

6. Spezielle Methoden und Ergebnisse

61. Vorarbeiten und Diskussion ihrer Ergebnisse

611. Vorarbeiten zur Verminderung von Mutanten in den Phagenstämmen

Die als Helferphagen eingesetzten Stämme T_2r und T_2h^+ enthielten einen zu hohen Anteil von T_2r^+- und T_2h-Phagen (Rück- bzw. Hinmutanten).

Bei T_2Lrh lag die r^+/r-Rate bei 10^{-6}. Sie führte in den ersten Rekombinationsexperimenten vom Typ r^+/r - Kl2(λ)/λ +) zu einem unerwunscht hohen, unspezifischen T_2r^+-Hintergrund. Die erforderliche Suche nach einem genetisch stabileren T_2r mit einer r^+/r-Rate von höchstens 10^{-8} gestaltete sich sehr langwierig. Nach Anzüchten von Phagen aus etwa 100 Einzelplaques wurde ein T_2r-Stamm gefunden, dessen r^+/r-Rate bei $\lesssim 10^{-9}$ lag++). Er wurde "T_2r_sh" benannt (Index$_s$ = stabil).

+) vgl. S. 48 und Tabelle 7 S. 47

++) Nach den Erfahrungen von Benzer (4) tritt eine derart hohe genetische Stabilität nur mit geringer Wahrscheinlichkeit auf. Von 123 r-Mutanten Benzers zeigte nur eine die Revertantenrate von 10^{-8}.

Bei $T_2r^+h^+o$ lag die h-Mutantenrate ebenfalls bei $\sim 10^{-6}$. Hier konnte auf die langwierige Suche nach einem genetisch stabileren h^+ verzichtet werden, da die Eigenschaften h^+ und h das Adsorptionsverhalten betreffen+). Der h-Anteil im h^+-Stamm wurde durch Adsorption an B/2+) (37°C, flüssiges Medium, 5'..10') und anschließendes Zentrifugieren (4°C) um zwei Zehnerpotenzen von 10^{-6} auf 10^{-8} gesenkt. Die h^+-Phagen blieben auf diese Weise unadsorbiert im Überstand. Das Sediment, bestehend aus B/2 und adsorbierten h-Phagen, wurde verworfen.

612. Prüfung des neu isolierten Stammes T_2r_sh auf Rekombinationsfähigkeit

Nach einer Zweifaktorkreuzung $T_2r^+h^+ \times T_2r_sh$ in der Wirtszelle K12(λ)/λ wurde in der Nachkommenschaft ein Verhältnis $T_2r^+h : T_2r^+h^+ = 1 : 50 = 2\%$ gefunden. Hierzu war die Nachkommenschaft geeignet vorverdünnt, mit K12(λ)/λ in flüssigem Medium 10' bei 37°C präinkubiert und anschließend mit B/2 plattiert worden. T_2r-Phagen gaben auf diese Weise keine, $T_2r^+h^+$ trübe und T_2r^+h klare Plaques.

Rekombinationsfähigkeit wurde außerdem durch das Ergebnis der Experimente im Abschnitt 615., S.30 und der Kontrollen im Abschnitt 6226., S.53-54 gezeigt.

Die neu isolierte T_2r-Mutante erschien demnach hinsichtlich Revertantenrate und Rekombinationsfähigkeit für die geplanten Experimente geeignet.

613. Ermittlung optimaler Bedingungen für den Harnstoff-Abbau von T_2-Phagen

Durch Behandlung von T_2-Phagen mit hochmolaren Harnstofflösungen entstehen sogenannte "Harnstoff-T_2-Partikel" oder kurz "HT_2-Partikel". HT_2-Partikel sind komplexe Substrukturen

---

+) vgl. S. 9

von T_2 mit verändertem Schwanzaufbau, erweitertem Wirtsbereich, vergrößerter Proteasensensibilität und unveränderten antigenen Eigenschaften (45,47). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit ihnen, weil erstens HT_2 für Sphaeroplasten infektionstüchtig+) sind und zweitens ein Teil der T_2r^+-DNS-Infektionsversuche an analoge T_4r^+-DNS-Infektionsversuche (69,90,91,92) angelehnt werden sollte, in denen mit Penicillin-Sphaeroplasten und harnstoffabgewandelten T_4r-Helfern gearbeitet worden war.

Das Ziel dieser Vorarbeit bestand in der Ermittlung von Bedingungen, unter denen ein möglichst hoher absoluter Titer von infektionstüchtigen HT_2-Partikeln erhalten werden konnte.

Der absolute HT_2-Titer wurde so bestimmt, daß 0,[illegible] ml oder 0,1 ml einer geeignet verdünnten HT_2-Präparation mit 0,1 ml B_{ST} in 0,5 ml Medium E (2% RA) 10' bei 37°C preinkubiert und anschließend mit Saccharose-Soft-Agar (2% RA) und B-Indikatorbakterien plattiert wurden (45). Mit B_{LS} an Stelle von B_{ST} ergab sich ein annähernd gleicher, mit B_B an Stelle von B_{ST} ein um mehrere Zehnerpotenzen niedrigerer Titer. Der "relative Titer" ist der Quotient aus absolutem Titer und Titer der Ausgangsphagen vor dem Harnstoffabbau (HT_2/T_2). Er ist ein Maß für die Ausbeute und somit unter gleichen Titrationsbedingungen ein Maß für die Leistungsfähigkeit einer Abbaumethode.(45).

Der Abbau wurde zunächst nach Hofschneider (45) durchgeführt. Hierbei ergab sich im günstigsten Einzelfall ein relativer Titer von $2{,}5 \times 10^{-7}$ HT_2/T_2 (absolut 5×10^{1} HT_2/ml). In der Regel fanden sich relative Titer von $10^{-8}..10^{-9}$ HT_2/T_2. Dies stand im Gegensatz zu Hofschneiders Ergebnissen, der relative Titer von $1..2 \times 10^{-5}$ HT_2/T_2 erzielt hatte. Die Ursache hierfür wurde in der Verschiedenheit der Chemikalienchargen gefunden, da eine HT_2-Präparation mit einem Rest der von Hofschneider verwendeten Harnstofflösung ceteris paribus einen relativen Titer von $1{,}1 \times 10^{-5}$ HT_2/T_2 ergab. Es erwies sich demnach als notwendig,

---

+) Von T_2 sagte die Literatur (28,81,65) in Bezug auf Lysozym-Sphaeroplasten das Gegenteil. Vgl. jedoch Abschnitt 615., S. 30 .

Methode Nr.	Behandlung der Phagensuspensionen Nr. 1+) und 2+) mit den Harnstofflösungen H1+) und H2+)	Ausbeute (rel. Titer) HT_2/T_2
1)	Phagensusp. 1 1:5 in H1 verdünnt, 30' 37°C	$4,7 \times 10^{-7}$
2)	Phagensusp. 1 1:5 in H1 " 60' 20°C	$6,3 \times 10^{-6}$
3)	Phagensusp. 2 1:5 in H2 " 30' 37°C	$1,6 \times 10^{-7}$
4)	Phagensusp. 2 1:5 in H2 " 60' 20°C	$1,3 \times 10^{-5}$
5)	Phagensusp. 1 12 h gegen H1 bei 4°C dialysiert	$5,3 \times 10^{-6}$
6)	Phagensusp. 2 12 h " H2 bei 4°C "	$2,7 \times 10^{-6}$

+) Phagensuspension 1: dialysiert gegen 0,1 m NaCl 4°C; Phagensuspension 2: dialysiert gegen 0,2 m NaCl 0,05 m Tris pH 7,5 4°C;
H1 = 8 m Harnstoff 0,1 m NaCl; H2 = 6 m Harnstoff 0,2 m NaCl 0,05 m Tris pH 7,5.
Jeweils wässrige Losungen, pH mit HCl eingestellt.

Tab. 2: Versuche zur Ermittlung optimaler Bedingungen für die HT_2-Präparation. Näheres vgl. Text.

die optimalen Bedingungen der Harnstoffumwandlung für unsere Chemikalienchargen neu zu ermitteln.

T_2Lrh-Phagensuspensionen mit einem Titer von $1{,}5 \times 10^{11}$/ml wurden gegen zwei verschiedene Salzlösungen dialysiert (Phagensuspensionen Nr. 1 und 2) und sodann verschiedenen Behandlungen mit zwei Harnstofflösungen ("H1" und "H2") unterzogen. Abschließend wurde durch Dialyse gegen 0,1 m NaCl bei 4°C der Harnstoff um einen Faktor $10^{-5}..10^{-6}$ ausverdünnt und der HT_2-Titer in der angegebenen Weise bestimmt. Einzelheiten und Ergebnisse zeigt die Tabelle 2 auf S. 24, die im wesentlichen demonstrieren soll, daß bei der HT_2-Herstellung geringe methodische Unterschiede zu großen Differenzen in den Resultaten führen.

Mit der Methode Nr. 4 der Tabelle 2 ließ sich der höchste relative Titer, das heißt die höchste Ausbeute erzielen. Die Methode Nr. 5 führte dagegen zu einem höheren absoluten Titer, da der 1:5-Verdünnungsschritt entfiel. Da für unsere Zwecke ein möglichst hoher absoluter Titer erwünscht war, wurden die für DNS-Infektionsversuche bestimmten HT_2-Partikel nach der Methode Nr. 5 hergestellt, und zwar aus hochtitrigen Phagensuspensionen. Die hierbei erzielten absoluten HT_2-Titer lagen bei 8×10^6 HT_2/ml (relat. Titer 2×10^{-6} HT_2/T_2) und 6×10^8 HT_2/ml (relat. Titer $1{,}0 \times 10^{-4}$ HT_2/T_2). Die HT_2 wurden nach der Ausverdünnung des Harnstoffs sofort weiterverwendet oder bei 4°C aufbewahrt.

614. Ermittlung optimaler Induktions- und Inkubationsbedingungen für Penicillin-Sphaeroplasten+)

Penicillin-Sphaeroplasten wurden in Anlehnung an die Methoden von Lederberg (56) und Liebermeister u. Kellenberger (59) induziert. Zunächst wurde wie folgt vorgegangen:

Eine E. coli B - Übernachtkultur (~ 2×10^9 Bakt/ml) wurde 1:5 in Saccharose-Pepton-Medium verdünnt. 10 ml der verdünnten

---

+) vgl. Fußnote S. 11

Kultur wurden 30' bei 37°C unter Belüftung präinkubiert, mit 0,2 ml 10%igem $MgSO_4$ und 0,05 ml Penicillin-Lösung (Penicillin G, 200000 I.E. in 1 ml Wasser) versetzt, weiter bei 37°C inkubiert und nur noch schwach belüftet. Die Umwandlung in Sphaeroplasten wurde im Phasenkontrastmikroskop verfolgt.

Obwohl dieser Weg sich nach früheren Erfahrungen (48) bewährt hatte, führte er jetzt nicht mehr zu morphologisch guten Sphaeroplasten. Deshalb mußten optimale Induktionsbedingungen neu ermittelt werden.

Es wurden der Grad der Vorverdünnung (1:5 bis 1:50), die Präinkubationsbedingungen (Medium, Zeit und Belüftungsstärke), die Penicillinkonzentration (750 bis 2000 I.E. pro ml Bakteriensuspension) und die Inkubationsbedingungen nach der Penicillinzugabe (Zeit, Belüftungsstärke) systematisch variiert. Nach der Penicillinzugabe wurden die Zellen alle 30' unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet+).

Die folgenden Bedingungen erwiesen sich als optimal: 1 ml Übernachtkultur + 9 ml Saccharose-Pepton (1:10 Verdünnungsschritt, Titer danach $2x10^8$/ml), Präinkubation 30' bei 37°C und starker Belüftung, Zugabe von 0,2 ml 10%igem $MgSO_4$ und 0,05 ml Penicillinlösung (ergab eine Penicillinkonzentration von 1000 I.E./ml), Weiterinkubation bei 37°C und sehr schwacher Belüftung oder im Schüttelbad. 30' nach der Penicillinzugabe wurden $1x10^8$ Zellen/ml gezählt, die zu über 90% glattrandig-rund, optisch homogen und kompakt aussahen, nach 60' an Volumen zugenommen hatten und dann bis zu einigen Stunden unverändert blieben. Bei Änderung der Bedingungen z.B. einer Vorverdünnung von nur 1:5 wurde 30' nach der Penicillinzugabe eine starke Verklumpung unregelmäßig gelappter und gezahnter Zellen beobachtet. Die Vorverdünnung

---

+) Zur Frage der morphologischen Kriterien bei der Beurteilung von Penicillin-induzierten Umwandlungsformen aus E. coli vgl. die Photographien von Lederberg und St. Clair (57), dort auch eine ausführliche Diskussion der kritischen Umwandlungsfaktoren.

1:20, ceteris peribus, führte zu morphologisch guten Sphaeroplasten, jedoch in geringerem Titer. Höhere Penicillinkonzentrationen haben sich nicht bewährt, da hierbei ein großer Anteil der Sphaeroplasten rasch lysierte. Bei niedrigen Penicillinkonzentrationen verweilten die Zellen länger in einem keulenförmigen Übergangsstadium oder blieben in diesem stehen.

Beim Übergang zu anderen Bakterienstämmen oder anderen Materialchargen (besonders bei Broth- und Peptonwechsel) mußten die Optimalbedingungen durch Variation der obigen Parameter jeweils neu ermittelt werden. Es zeigte sich außerdem, daß mit denselben Bakterien, denselben Medien und denselben Magnesium- und Penicillinlösungen gleich angesetzte Sphaeroplastierungen zu Unterschieden in den Ergebnissen, wahrscheinlich infolge schlecht standardisierbarer Belüftung, führten. Aus diesem Grunde wurden zu den folgenden und zu den DNS-Versuchen jeweils drei 10 ml-Verdünnungen zur Sphaeroplastierung angesetzt und die morphologisch best-umgewandelten Zellen zur Verwendung ausgewählt.

Da in den geplanten DNS-Versuchen der Nachweis infektiöser DNS auf Phagenneubildung beruhte+), mußten die Sphaeroplasten, nachdem die Bedingungen für optimale morphologische Umwandlung ermittelt waren, auf ihre Fähigkeit zur Phagensynthese geprüft werden. In den DNS-Versuchen war ein "Verstärkereffekt" durch eine möglichst hohe Wurfgröße oder durch weitere Vermehrungszyklen zunächst erwünscht++). Aus diesem Grunde war nicht allein qualitativ die Fähigkeit zur Phagensynthese überhaupt, sondern auch deren quantitatives Ausmaß ein Kriterium für die Eignung von Bakterienzellen zu DNS-Infektionsversuchen.

Zur Prüfung der Phagensyntheseleistung wurden 1,0 ml gut umgewandelter E. coli B-Penicillin-Sphaeroplasten (Titer

---

+) vgl. Abschnitt 43., S. 11-12

++) vgl. Abschnitt 43., S. 13-14

1..2x10^8 Zellen/ml) im Umwandlungsmedium 30'..65' nach der Penicillinzugabe mit 0,1 ml harnstoffinduzierten T_2-Abbaupartikeln ("HT_2", Titer auf B_{ST} - B_B +) 6x10^6 HT_2/ml und auf B_B < 10^1 HT_2/ml) infiziert und bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Inkubationszeiten wurden Aliquote entnommen, über Chloroform verdünnt und auf B_B titriert. Zur Infektion wurden HT_2 und nicht T_2 gewählt, weil die Plaquebildung von HT_2 auf B_B zu vernachlässigen ist++) und deshalb unadsorbiert bleibende Infektionspartikel (HT_2) die Bestimmung der neusynthetisierten Partikel (T_2) nicht stören konnten.

Im Anfang lagen die erzielten T_2-Titer unter dem auf B_{ST} - B_B +) gemessenen HT_2-Ausgangstiter zum Infektionszeitpunkt (vgl. Abb. 2, S. 29 untere Kurvenschar). In Serienversuchen konnte durch systematische Variation der Medien (Konzentration und Bestandteile) und durch Belüftungseffekte (Schütteinkubation und Wahl einer großen Oberflächen/Volumen-Relation) die Gesamtausbeute an Phagen bis zu 4 Zehnerpotenzen gegenüber den Anfangswerten gesteigert werden (vgl. Abb. 2, S. 29 obere Kurvenschar). Optimales Medium war eine Mischung aus 2 Volumina Fraser-Medium und 1 Volumen 1 m Saccharose. Rinderalbuminzusatz hemmte leicht. Sperminzusatz hemmte bei einer Konzentration von 10^{-3} m und steigerte nur geringfügig - um einen Faktor von 2 bis 3 - bei 10^{-4} m. Sphaeroplasten aus den lysegehemmten Bakterien E. coli B/B, welche eine nochmals gesteigerte Gesamtausbeute erhoffen ließen, sowie Verwendung von quarzdestilliertem Wasser anstelle des üblichen Ionenaustauscherwassers brachten keine Vorteile.

Unter den ermittelten optimalen Umwandlungs- und Synthesebedingungen wurde ein großer Teil der DNS-Infektionsversuche durchgeführt. Da gutes morphologisches Aussehen und gute Phagenvermehrungsleistung nicht allein Kriterien für gute Kompetenz gegenüber DNS sind, wurden auch ohne Rücksicht auf voll-

---

+) Zur Methode der HT_2-Titerbestimmung vgl. S. 23

++) vgl. S. 23

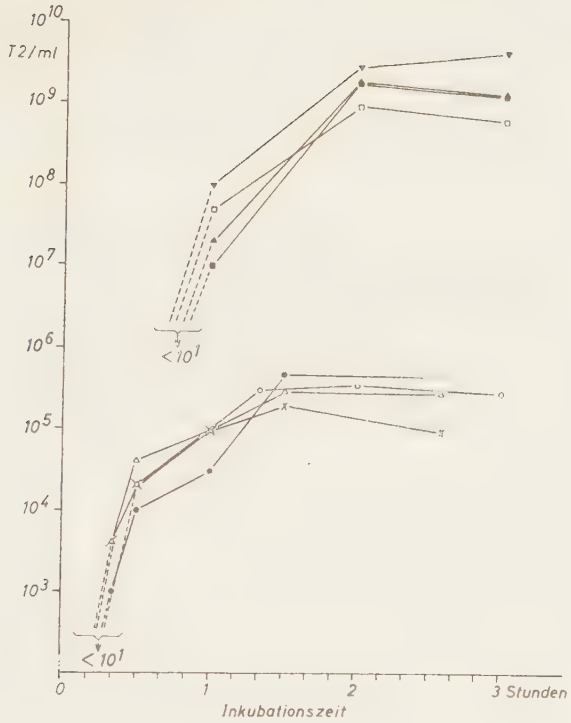

Abb. 2: Phagensyntheseleistung von HT_2-infizierten E. coli B-Penicillin-Sphaeroplasten

Ordinate: T_2/ml auf B_B nach Chloroform-provozierter Lyse; Abszisse: Inkubationszeit t

HT_2-Titer bei Infektion (t = 0') $5,5 \times 10^5$ HT_2/ml auf B_{ST} - B_B und $< 10^1$ HT_2/ml auf B_B

Untere Kurvenschar: 4 Ansätze unter Ausgangsbedingungen

Obere Kurvenschar: 4 Ansätze nach Suche optimaler Bedingungen

Näheres vgl. Text

ständige Umwandlung oder auf gute Syntheseleistung Penicillin-Sphaeroplasten eingesetzt. Zu morphologisch guten, in DNS-Versuchen bei uns aber nie kompetenten Sphaeroplasten führte auch eine methodische Variante nach Veldhuisen (90, 91,92), bei der die Zellen in einem Salz-Glucose-Saccharose-Medium bei Gegenwart von 2% Rinderalbumin umgewandelt wurden.

615. Infizierbarkeit von E. coli-ST-Zellen und -Lysozm-Sphaeroplasten durch intakte T_2-Phagen

Die T_2-DNS-Infektionsversuche mit Sphaeroplasten und ST-Zellen sahen eine Superinfektion mit Helferphagen vor. Da zur Erzielung einer hohen Helferphagen-Infektionsmultiplizität die Verwendung von intakten Phagen anstelle von HT_2 geeigneter erschien+), war wichtig zu wissen, ob E. coli-Sphaeroplasten und -ST-Zellen von intakten T_2-Phagen infiziert werden können oder nicht.

Von Penicillin-Sphaeroplasten ist bekannt, daß sie sich in Infizierbarkeit und Wurfgröße kaum von unbehandelten, normalen Bakterien unterscheiden (19). Über ST-Zellen liegen zu dieser Frage keine Untersuchungen vor. Von Lysozym-Sphaeroplasten teilten einige Autoren (28,81,65) mit, daß sie von intakten T_2-Phagen nicht infiziert würden. Dies wurde daraus geschlossen, daß, soweit angegeben, nach Phagenzugabe zu Sphaeroplasten kein Phagentiteranstieg gemessen werden konnte. In eigenen Experimenten wurde auf diese Weise ebenfalls kein deutlicher Titeranstieg festgestellt. Jedoch lassen sich diese Befunde anders deuten: Phageninfektion und -synthese könnten stattfinden, in ihrem Umfang indessen so gering sein, daß die Zahl der neugebildeten Phagen die vermutlich größere Zahl der nichtadsorbierten, alten Phagen nicht signifikant zu erhöhen vermöchte. Desweiteren ist gezeigt worden, daß nach Lysozym-Behandlung der Phagenrezeptor an der Zelloberfläche verbleibt und Phagen noch adsorbiert wer-

---

+) vgl. Abschnitt 721, S.61 Absatz "Zu 3)" und Abschnitt 7223. S. 66

den (42,60). Es erscheint demnach unwahrscheinlich, daß auf die Adsorption keine vollständige Infektion mit DNS-Injektion und Phagenneusynthese folgen sollte, sofern EDTA+) hinreichend ausverdünnt wird.

Zur experimentellen Entscheidung dieser Frage wurde ein Kreuzungsreaktivierungssystem (1,2) entwickelt, das neugebildete Phagen von nichtadsorbierten, alten Phagen zu unterscheiden erlaubte. Es wurden K12(λ)/λ_B, K12(λ)/λ_{ST} und K12(λ)/λ_{LS} mit UV-inaktivierten T_2r^+ ++) und unbestrahlten T_2r in Medium E (0,5% RA) infiziert, 60' bei 37°C inkubiert und mit K12(λ)/λ_D auf T_2r^+-Neubildung geprüft. Nichtadsorbierte, alte Phagen ergaben auf diese Weise keine Plaques. Eine Übersicht über ein typisches Experiment und seine Ergebnisse gibt die Tabelle 3 auf Seite 32.

In allen drei Fällen A, B und C wurde in den Ansätzen 1) und 2) signifikant stärkere Plaquebildung beobachtet als in den Kontrollen 3) bis 6). Dies bedeutet, daß in allen Fällen eine Mischinfektion stattgefunden haben muß, daß also Lysozym-Sphaeroplasten und ST-Zellen mit intakten T_2-Phagen produktiv infiziert worden sind. Mit Lysozym-Sphaeroplasten lag hierbei die Rekombinanten-Neubildung um einen Faktor von etwa 4, mit ST-Zellen um einen Faktor von etwa 180 niedriger als mit Normalbakterien. In einem anderen Experiment, in welchem frisch bereitete, um einen Tag jüngere ST-Zellen als in dem vorgenannten verwendet wurden, erreichte die Rekombinanten-Neubildung der ST-Zellen fast die der Sphaeroplasten. Zugabe von T_2rh-DNS beeinflußte die Ausbeute nicht. Die Umwandlung in Sphaeroplasten wurde nach Hofschneider (45) durchgeführt und im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert; sie war zum Zeitpunkt der Infektion bei über 95% der Zellen vollzogen.

+) EDTA, das bei der Lysozym-Sphaeroplastierung mitwirkt, hemmt den DNS-Injektionsschritt bei der Phageninfektion (1).

++) Zur Methode der UV-Bestrahlung siehe S. 21 . Derart UV-bestrahlte Phagen sind in der DNS geschädigt und im Injektionsmechanismus praktisch ungeschädigt, da die verwendete UV-Wellenlänge nahe beim Absorptionsmaximum von DNS und fern vom Absorptionsmaximum des Proteins liegt (1).

Nr.	ANSATZ +) Med E 0,5% RA (ml)	T_2r-Suspension (ml)	UVT_2r^+-Suspension (ml)	Zellsuspension	ERGEBNIS Titer auf $K12(\lambda)/\lambda_B$ (Ph/ml)
A				$K12(\lambda)/\lambda_B$	
1)	0,5	0,1	0,1	0,1	$1,6x10^4$
2)	0,5	0,1	0,1	0,1	$1,9x10^4$
3)	0,5	0,2	-	0,1	< 5
4)	0,5	0,2	-	0,1	< 5
5)	0,5	-	0,2	0,1	< 30
6)	0,5	-	0,2	0,1	< 20
B				$K12(\lambda)/\lambda_{ST}$	
1)	0,5	0,1	0,1	0,1	$0,9x10^2$
2)	0,5	0,1	0,1	0,1	$1x10^2$
3)	0,5	0,2	-	0,1	< 5
4)	0,5	0,2	-	0,1	< 5
5)	0,5	-	0,2	0,1	< 10
6)	0,5	-	0,2	0,1	< 10
C				$K12(\lambda)/\lambda_{LS}$	
1)	0,5	0,1	0,1	0,1	$6x10^3$
2)	0,5	0,1	0,1	0,1	$3x10^3$
3)	0,5	0,2	-	0,1	< 5
4)	0,5	0,2	-	0,1	< 5
5)	0,5	-	0,2	0,1	< 20
6)	0,5	-	0,2	0,1	< 30

+) T_2r-Suspension $4x10^{10}$ Ph/ml; UVT_2r^+-Suspension $4x10^{10}$ Phagenäquivalente/ml; Zellsuspensionen jeweils $5x10^9$ Zellen/ml; Inkubation 60' 37°C ohne aktive Belüftung

Tab. 3: Kreuzungsreaktivierung T_2r x $UVT_2r^+ \longrightarrow T_2r^+$ zur Demonstration der T_2-Phageninfizierbarkeit von E.coli-Lysozym-Sphaeroplasten und -ST-Zellen.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, daß es sinnvoll ist, bei T_2-DNS-Infektionsversuchen mit Lysozym-Sphaeroplasten und ST-Zellen intakte Helferphagen zur Superinfektion zu verwenden. Die Literaturangaben (28,81,65) sind damit in diesem Punkte widerlegt.

616. Vorarbeiten zum Problem der Vermeidung von Exclusion

Ein T_2-infiziertes Bakterium schließt wenige Minuten nach der Infektion einen zweitinfizierenden T_2-Phagen von der Vermehrung aus. Dieses Phänomen heißt "Exclusion" (23,1). Exclusion ist bei T_2-DNS-Infektionsversuchen in gleicher Weise zu erwarten, wenn zwischen Helferphageninfektion und DNS-Infektion eine relativ zu lange Zeitspanne verstreicht. Denn der Mechanismus der Phagenexclusion beruht nicht auf einem Rezeptorphänomen, welches möglicherweise durch freie DNS umgangen werden könnte, sondern auf intrazellulären Vorgängen, die an die einsetzende Entwicklung der Primärphagen gebunden sind und in der teilweisen Depolymerisation der Sekundärphagen-DNS ausmünden (1,82).

Bei einem Teil der durchgeführten T_2-DNS-Infektionsversuche mußte die Exclusionsgefahr vermieden werden. Es waren dies Versuche, bei denen die Wirtszellen im unvorbehandelten Zustand bei 37°C mit Helferphagen infiziert, sodann bei 0°C ST-gewaschen und anschließend bei 37°C mit DNS infiziert wurden+). Kritisch ist hierbei die Zeitspanne zwischen der Beimischung der Helferphagen und dem Abkühlungszeitpunkt. Bei 0°C ist die Entwicklung des Primärphagen, welche eine Vorbedingung für Exclusion ist, sehr stark gehemmt. Der optimale Abkühlungszeitpunkt ist derjenige, bei dem die Rate der infizierten, aber noch nicht excludierenden Bakterien am höchsten ist. Um ihn zu ermitteln, wurden zwei Größen gegeneinander abgeschätzt: Die Infektionszeit und die Exclusionszeit.

+) Siehe Abschnitte 621. S. 38 und 622. S. 48

1) Die Infektionszeit: Hierzu wurden Bakterien unter Bedingungen wie in den DNS-Infektionsversuchen bei 37°C mit Helferphagen durchmischt (Zeit 0) und nach verschiedenen Zeiten rasch in Eiswasser abgekühlt. Uninfizierte Bakterien wurden als Kontrolle der gleichen Abkühlung unterworfen. Vor der Phagenzugabe waren der Bakterientiter im Kolonientest und der Titer der Helferphagensuspension gemessen worden. Nach der Abkühlung wurden jeweils bestimmt: 1. Der Bakterientiter im Kolonientest, 2. die gesamte Plaquebildung (infektiöse Zentren + freie Phagen), 3. die freien Phagen durch Verdünnen über Chloroform; daraus ergibt sich 4. als Differenz zur gesamten Plaquebildung die Zahl der infektiösen Zentren. Die Temperatur von 0°C wurde in allen Verdünnungsreihen bis zum Plattieren beibehalten.

   Es ergab sich folgendes: Zur Erzielung einer hohen Zahl von infektiösen Zentren muß mit dem Abkühlen bis 2 Minuten nach der Phagenzugabe gewartet werden. Nach einer Minute sind zwar schon ebenso viele Bakterien getötet wie nach längeren Zeiten, eine Bildung von infektiösen Zentren ist hingegen noch nicht sicher nachzuweisen.

2) Die Exclusionszeit: Die Bakterien wurden mit den Phagen T_2r und T_2r^+ gleichzeitig ($\Delta t = 0$) und in verschiedenen zeitlichen Abständen Δt in flüssigem Medium infiziert und bei 37°C bis zur Lyse inkubiert. Die Ausbeute an Phagen des zweitinfizierenden Typs betrug beispielsweise bei $\Delta t = 2'$ nur noch 30% der Ausbeute bei $\Delta t = 0$; bei $\Delta t = 8'$ waren es 1% und bei $\Delta t = 20'$ 0,1%.

Die Ergebnisse zeigen, daß das erwünschte Optimum von möglichst guter Helferphageninfektion und möglichst geringer Exclusion durch Temperaturerniedrigung allein nicht erreichbar ist. Die zur Verfügung stehenden Zeiten sind zu kurz für gute Infektion und zu lang für geringe Exclusion.

Sicherer als Temperaturerniedrigung allein überbrückt das Antibiotikum Chloramphenicol+) trotz guter Infektion mit Helferphagen die kritische Zeitspanne zwischen Helferinfektion und Abkühlung. Dies wird durch folgende Nebenexperimente sichergestellt.

Je 1 ml E. coli B_1 in Standard-Medium frisch gewachsen auf $2{,}8 \times 10^8$ Bakt/ml, wurde bei 37°C

A. ohne Chloramphenicol
   Aa. mit T_2h und T_2r^+ gleichzeitig infiziert,
   Ab. mit T_2h primär- und nach Ablauf von 3 Minuten mit T_2r^+ sekundärinfiziert,

B. unter Chloramphenicol
   Ba. mit T_2h und T_2r^+ gleichzeitig infiziert,
   Bb. mit T_2h primär- und nach Ablauf von 3 Minuten mit T_2r^+ sekundärinfiziert.

Das Chloramphenicol war 1 Minute vor der Primärinfektion zu einer Konzentration von 45 γ/ml beigemischt worden. Die Infektionsmultiplizitäten betrugen 3,6 T_2h/Bakt und 3,6 T_2r^+/Bakt. Die Röhrchen Aa und Ba wurden 4 Minuten nach Infektion, die Röhrchen Ab und Bb 5 Minuten nach der Primär- und 2 Minuten nach der Sekundärinfektion in Eiswasser gekühlt. Aliquote von 0,05 ml wurden über Chloroform verdünnt und auf freie Phagen titriert. Anschließend wurden die infizierten Bakterien bei 0°C in einer Zentrifuge sedimentiert und in einigen ml Standard-Medium von 0°C resuspendiert. Diese "Wäsche" wurde mehrmals wiederholt. Hierbei verdünnte sich das Chloramphenicol, wo zugegeben, um einen Faktor von $10^{-3}..10^{-4}$. Das Sediment des letzten Schrittes der Wäsche wurde in 1 ml Standard-Medium aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Zu den Zeiten 0' (= Inkubationsbeginn), 10', 20', 30' und 45' wurden Aliquote von 0,05 ml über Chloroform verdünnt und auf Phagen titriert. Selektiver Indikator für T_2h

---

+) Chloramphenicol als Inhibitor der Proteinbiosynthese verhindert die Bildung der Enzyme, die zur Phagen-DNS-Synthese notwendig sind. (38,13,64,89,1) Den DNS-Injektionsprozeß während der Phageninfektion beeinflußt es nicht (1).

war E. coli B/2, für T_2r^+ E. coli K12(λ)/λ. Auf diese Weise ergaben sich aus den 4 Ansätzen Aa, Ab, Ba, Bb die 8 Kurven Aah, Aar^+, Abh, Abr^+, Bah, Bar^+, Bbh, Bbr^+. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 3 auf Seite 37.

Ohne Chloramphenicol betrug die Ausbeute an Sekundärphagen rund 4% derjenigen an Primärphagen: Deutliche Exclusion (Kurven Abh und Abr^+). Mit Chloramphenicol fand eine Exclusion des Sekundärphagen nicht statt (Kurven Bbh und Bbr^+). Die Kurven Aah, Aar^+, Bah, Bar^+ sind Vergleichskurven für gleichzeitige Infektion. Die zeitliche Verschiebung des steilen Abschnitts der Kurven B gegenüber dem der Kurven A ist durch Chloramphenicolhemmung vor der Wäsche erklärbar. In diesem Experiment wurde nach Chloramphenicol im Niveau nur 1/3..1/5 des Vergleichswertes ohne Chloramphenicol erreicht (Kurven B und Aa), vielleicht wegen ungenügender Chloramphenicolverdünnung. Im Bereich $t < 10'$ sind die Kurven durch nichtadsorbierte, freie Phagen, durch reversibel adsorbierte Phagen und durch unterschiedliche Adsorptionszeiten verfälscht.

In einem weiteren Chloramphenicol-Vorexperiment wurde geprüft, ob nach einer Ausverdünnung des Chloramphenicols (25 γ/ml Anfangskonzentration) um den Faktor $10^{-4}..10^{-5}$ die Fähigkeit infizierter Bakterien zur Phagenbildung und uninfizierter Bakterien zur Kolonienbildung beeinträchtigt wurde. Kolonienzahl und Phagenzahl zeigten nach einstündiger Inkubation das gleiche Niveau wie die Kontrollen ohne Chloramphenicol.

Nach dem Ergebnis der vorliegenden Vorexperimente ist es also möglich, Exclusion des Sekundärphagen durch Chloramphenicol-Hemmung des Primärphagen zu verhindern. Eine Hemmung der Phagenbildung ist nach einer Ausverdünnung des Chloramphenicols um den Faktor $10^{-4}..10^{-5}$ nicht zu befürchten.

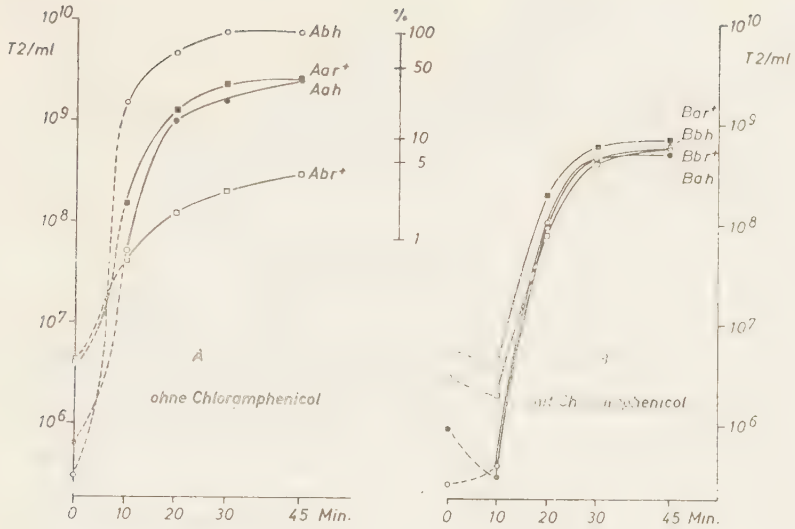

Abb. 3: Vermeidung der Exclusion mit Chloramphenicol

Durchführung und Einzelheiten vgl. Text. Ordinate außen: intra- + extrazelluläre reife T_2-Phagen pro ml; Ordinate innen: Ausbeute in % der Ausbeute an Primärphagen ohne Chloramphenicol; Abszisse: Inkubationszeit

Die Elemente der Kurvenbezeichnungen bedeuten:

A	Infektion ohne Chloramphenicol	linke Kurvenschar	
B	Infektion unter Chloramphenicol	rechte Kurvenschar	
a	gleichzeitige Mischinfektion mit T_2h und T_2r^+	ausgefüllte Symbole	-●- bzw. -■-
b	Infektion mit T_2h (Primärphage) 3 min vor Infektion mit T_2r^+ (Sekundärphage)	offene Symbole	-○- bzw. -□-
h	T_2h (in den Fällen b Primärphage)	runde Symbole	-○- bzw. -●-
r^+	T_2r^+ (in den Fällen b Sekundärphage)	quadratische Symbole	-□- bzw. -■-

62. DNS-Infektionsversuche

621. Versuche mit positiven Ergebnissen

Positive Ergebnisse wurden mit dem Rekombinationssystem r^+-DNS x r-Helferphage+) in den folgend beschriebenen Experimenten erzielt.

6211. Übersicht über die Versuchsanordnung

E. coli K12(λ)/λ wurden aus einer Vorkultur in Standard-Medium verdünnt, bei 37°C unter guter Belüftung wieder anwachsen gelassen, mit T_2r-Helferphagen infiziert, in Eiswasser abgekühlt, bei 0°C einer Saccharose-Tris-Wäsche++) unterzogen, mit DNS aus T_2r^+-Phagen unter Zusatz von Rinderalbumin in Medium E^- bei 37°C infiziert und einige Stunden inkubiert, mit Chloroform lysiert und

a) zum Nachweis einer Rekombination zu T_2r^+-Phagen mit E. coli K12(λ)/λ und
b) zum Nachweis einer Komplementation mit E. coli B

auf Agar plattiert.

Zum Ausschluß von Fehlerquellen wurden folgende Kontrollen durchgeführt:

a. Ansatz ohne DNS. Diese Kontrolle schließt ein unspezifisch positives Ergebnis aus, welches durch T_2r^+-Phagen, die als Mutanten in den T_2r-Helferphagen enthalten sind, vorgetäuscht werden könnte.

b. Ansatz mit unspezifischer DNS anstelle der T_2r^+-DNS. Als unspezifische DNS wurde T_2r-DNS verwendet. Diese Kontrolle begegnet dem Einwand, zugesetzte DNS verändere im Inkubationsansatz die physikalisch-chemischen Bedingungen derart - beispielsweise im Sinne einer osmotischen Schutzwirkung -, daß die Wurfgröße der Bakterien erhöht und demzufolge unspezifische T_2r^+-Mutanten stärker vermehrt würden als in einer Kontrolle nach a..

+) vgl. Abschnitt 431., S. 12

++) ST-gewaschene Bakterien, die vor der ST-Wäsche mit Phagen infiziert worden sind, werden im folgenden mit dem Index "inf. ST" bezeichnet.

c. Verwendung von E. coli K12(λ)/λ_{ST} (zuweilen auch von E. coli K12(λ)/λ_B) anstelle von E. coli K12(λ)/$\lambda_{inf.ST}$. Diese Kontrolle schließt intakte Phagen oder infektionstüchtige Phagenabbaustufen in der T_2r^+-DNS als mögliche Ursache für ein unspezifisch positives Ergebnis aus.

d. Doppelte oder dreifache Ausführung des T_2r^+-DNS-Infektionsansatzes und der Kontrollansätze a. und b.. Hierdurch wird eine accidentelle Verunreinigung mit T_2r^+-Phagen als denkbare Ursache für ein unspezifisch positives Ergebnis ausgeschlossen.

Kontrollen mit Nucleasen, Proteasen und T_2-Antiserum wurden aus Gründen der Zeit- und Materialökonomie erst für den Fall vorgesehen, daß positive Ergebnisse mit relativer Sicherheit reproduziert werden können.

6212. Detaillierte Daten zweier repräsentativer Experimente

62121. Experiment I

a) Materialien (soweit nicht schon im Abschnitt 51. definiert):

T_2r^+-DNS: präpariert mit Phenol-Äther wie im Abschnitt 52., S. 20 beschrieben; Enddialyse gegen 0,1 m NaCl, biologisches Phagenäquivalent $2x10^{12}$ T_2r^+/ml (auf E. coli B).

T_2r-DNS: präpariert mit Phenol-Äther wie im Abschnitt 52., S. 20 beschrieben; Enddialyse gegen 0,1 m NaCl, biologisches Phagenäquivalent $5x10^{12}$ T_2r/ml (auf E. coli B).

Helferphagen: T_2r_sh, präpariert wie im Abschnitt 52., S. 18 beschrieben; Titer des Ausgangsstocks $5x10^{12}$ Ph/ml (auf E. coli B); Ausgangsstock 0,05/5,0 in Phosphatpuffer verdünnt und die verdünnte Suspension ($5x10^{10}$ Ph/ml) zur Infektion verwendet.

Standard-Medium: vor der Beimpfung mit Bakterien auf pH 5,0 mit 1 n HCl eingestellt.

Pepton: "P. e carne siccum".

Rinderalbumin: Hyland Laboratories.

E. coli K12(λ)/$\lambda_{inf.ST}$: E. coli K12(λ)/λ, über Nacht in 10 ml Standard-Medium bei mäßiger Belüftung und 37°C gewachsen (Titer rund $2x10^9$ Bakt/ml), wurden 1:200 in 100 ml Standard-Medium pH 5,0 von 37°C verdünnt, bei 37°C unter guter Belüftung auf einen Titer von $2,6x10^8$ Bakt/ml wachsen gelassen, mit 3,0 ml Helferphagensuspension (Titer $5x10^{10}$ Ph/ml) unter gutem einmaligem Durchschütteln infiziert (Multiplizität = 5,8 Ph/Bakt), über 70 sec. nach der Phagenzugabe ruhig bei 37°C belassen, dann in Eiswasser unter Schütteln abgekühlt, bei 0°C ST-gewaschen (Titer der E. coli K12(λ)/$\lambda_{inf.ST}$ = $2x10^9$ Bakt/ml) und sofort weiterverwendet.

E. coli K12(λ)/λ_B, E. coli B_B: frisch wachsende Kulturen in Standard-Medium pH 5,0 bei einem Titer von $\sim 2x10^9$ Bakt/ml.

b) Durchführung des Versuches:
10 Reagenzgläschen+) wurden bei 37°C nach den Angaben der Tabelle 4 auf S. 40-41 beschickt und 3 1/2 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Sodann wurden die T_2-Titer mit E. coli B_B und die T_2r^+-Titer mit E. coli K12(λ)/λ_B bestimmt. Die Ergebnisse faßt die Tabelle 4 zusammen. Die Angabe "direkt" bedeutet, daß der ganze Ansatz - nach Entnahme einer 0,05 ml-Probe für Verdünnungen - plattiert wurde. Verdünnt wurde über Chloroform. Die Titer (Ph/ml) wurden durch Multiplikation mit dem Ansatzvolumen auf Absolutzahlen (Ph/Ansatz) umgerechnet.

Dieses Experiment brachte das günstigste Ergebnis (siehe Seite 40-41). Als nächstes ist das ungünstigste Experiment dieser Serie beschrieben.

+) Zum Zwecke einer leichteren Vergleichsmöglichkeit der Tabellen 4 (S. 42-43), 5 (S.44-45), 6 (S. 46), 7 (S. 47) sind die Ansätze bei den verschiedenen Experimenten in gegenseitiger Entsprechung und nicht fortlaufend numeriert.

62122. Experiment II

a) Materialien:

DNS: in Präparationsmethode und Phagenäquivalenten wie in 62121. Exp. I, S. 39, jedoch andere Präparationen.

Helferphagen: wie in 62121., Exp. I, S. 39, jedoch neue 0,05/5,0 - Vorverdünnung aus dem Ausgangsstock.

Standard-Medium: wie in 62121. Exp. I, S. 39.

E. coli K12(λ)/$\lambda_{inf.ST}$: präpariert wie bei 62121. Exp. I, S. 40 beschrieben, jedoch mit folgenden Unterschieden: Titer bei Infektion $4x10^8$ Bakt/ml (statt $2,6x10^8$), Infektionsmultiplizität 4 T_2r/Bakt (statt 5,8).

Indikatorbakterien: wie bei 62121. Exp. I, S. 40 beschrieben.

Rinderalbumin und Pepton wie 62121.Exp. I, S. 39.

b) Durchführung des Versuchs:

wie bei 62121. Exp. I, S. 40 beschrieben, jedoch 3 h statt 3 1/2 h Inkubation. Die Werte gibt die Tabelle 5 auf S. 44-45. Zur Numerierung vgl. Fußnote S. 40.

6213. Zusammenstellung der Resultate der positiven Experimente

In den DNS-Infektionsansätzen von drei Experimenten des im Abschnitt 6211. (S. 38-39) beschriebenen Typs wurde eine signifikant stärkere Plaquebildung gegenüber den Kontrollansätzen beobachtet. Zwei von diesen Experimenten, das günstigste und das ungünstigste hinsichtlich der Plaquebildung in den Kontrollen, sind im Abschnitt 6212. auf Seite 39-45 vorgestellt worden. Das dritte wurde in sehr ähnlicher Weise wie die beiden anderen durchgeführt. Auch bei ihm war die verwendete DNS-Präparation frei von infektionstüchtigen T_2-Partikeln. Die Resultate dieser drei Experimente sind in Tabelle 6 auf S. 46 zusammengefaßt. Zum Vergleich ist ein negatives Experiment dieses Typs mitaufgeführt.

A N S A T Z Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11
1. Med E^- (1% RA) (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
2. DNS										
Typ:	r^+	r^+	r^+	keine	keine	r	r	r^+	r^+	keine
Volumen (ml)	0,05	0,05	0,05	-	-	0,05	0,05	0,05	0,05	-
T_2r^+-Äquivalente	10^{11}	10^{11}	10^{11}	-	-	$<10^2$	$<10^2$	10^{11}	10^{11}	-
3. Bakterien										
Kl2(λ)/λ inf.ST (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1			
Kl2(λ)/λ B (ml)								0,2	0,2	0,2
Zahl der Bakterien	$2,6 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	4×10^8	4×10^8	4×10^8
Multiplizitäten:										
T_2r-Helferph./Bakt	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	-	-	-
T_2r^+-Äquivalente/Bakt	390	390	390	-	-	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	250	250	-

E R G E B N I S :										
Beobachtete Plaquezahlen										
a. mit B_B								0	0	0
direkt								0	0	0
Verdünnung 10^{-3}	$\gtrsim 800$	$\gtrsim 800$	$\gtrsim 700$	~ 350	~ 400	~ 600	~ 600			
b. mit K12(λ)/λ_B										
direkt				0	0	0	f.L.			
Verdg. $1/2 \cdot 10^{-3}$	256	178	206	0	0	0	16			
Verdünnung 10^{-4}	52	35	33	0	0	0	0			
Titer T_2 (Ph/ml)	$\gtrsim 8 \times 10^5$	$\gtrsim 8 \times 10^5$	$\gtrsim 7 \times 10^5$	$\sim 3{,}5 \times 10^5$	$\sim 4 \times 10^5$	$\sim 6 \times 10^5$	$\sim 6 \times 10^5$	< 5	< 5	< 5
Titer T_2r^+ (Ph/ml)	5×10^5	$3{,}5 \times 10^5$	4×10^5	< 5	< 5	< 5	3×10^4	< 5	< 5	< 5
Zahl T_2 (Ph/Ansatz)	$\gtrsim 5 \times 10^5$	$\gtrsim 5 \times 10^5$	$\gtrsim 5 \times 10^5$	$\sim 2{,}1 \times 10^5$	$\sim 2{,}4 \times 10^5$	$\sim 4 \times 10^5$	$\sim 4 \times 10^5$	< 5	< 5	< 5
Zahl T_2r^+ (Ph/Ansatz)	$3{,}3 \times 10^5$	$2{,}3 \times 10^5$	$2{,}7 \times 10^5$	< 5	< 5	< 5	2×10^4	< 5	< 5	< 5
Zahl T_2r^+/Bakt	$1{,}3 \times 10^{-3}$	9×10^{-4}	1×10^{-3}	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	8×10^{-5}	$< 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	

Tab. 4: Übersicht über einen positiven DNS-Infektionsversuch vom Typ $T2r^+$-DNS x T2r-Phage $\longrightarrow$ $T2r^+$-Phage mit E.coli K12(λ)/λ als Wirtszelle. Dieses Resultat ist hinsichtlich der Plaquebildung in den Kontrollen das günstigste.

Näheres siehe Textabschnitt 62121., S. 39 ff.

A N S A T Z Nr.:	1	2	4	5	6	7	9	11	12
1. Med E^- (1% RA) (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	0,5
2. DNS									
Typ:	r^+	r^+	keine	keine	r	r	r^+	keine	keine
Volumen (ml)	0,1	0,02	-	-	0,05	0,05	0,1	-	-
T_2r^+-Äquivalente	$2x10^{11}$	$4x10^{10}$	-	-	$<10^2$	$<10^2$	$2x10^{11}$	-	-
3. Bakterien									
K12(λ)/$\lambda_{inf.ST}$ (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1			
K12(λ)/λ_B (ml)							0,5	0,5	0,5
Zahl der Bakterien	$4x10^8$	$4x10^8$	$4x10^8$	$4x10^8$	$4x10^8$	$4x10^8$	$2,5x10^8$	$2,5x10^8$	$2,5x10^8$
Multiplizitäten:									
T_2r-Helferph./Bakt	4	4	4	4	4	4	-	-	-
T_2r^+Äquivalente/Bakt	500	100	-	-	$<10^{-6}$	$<10^{-6}$	800	-	-

E R G E B N I S :									
Beobachtete Plaquezahlen a. mit B_B Verdünnung 10^{-2}	f.L.	f.L.	~1000	~800	~800	~1000	0	0	0
b. mit K12(λ)/λ_B Verdünnung 10^{-3}	~900	~700	0	117	3	68			
Titer T_2 (Ph/ml) Titer T_2r^+ (Ph/ml)	$\gtrsim 10^6$ $\sim 9x10^5$	$\gtrsim 10^6$ $\sim 7x10^5$	$\sim 10^5$ $< 10^3$	$\sim 8x10^4$ $1,2x10^5$	$\sim 8x10^4$ $\sim 10^3$	$\sim 10^5$ $7x10^4$	$< 10^2$	$< 10^2$	
Zahl T_2 (Ph/Ansatz) Zahl T_2r^+ (Ph/Ansatz)	$\gtrsim 7x10^5$ $6,5x10^5$	$\gtrsim 6x10^5$ $4,3x10^5$	$6x10^4$ $< 10^3$	$5x10^4$ $7x10^4$	$5x10^4$ $\sim 10^3$	$7x10^4$ $4,5x10^4$	$< 10^2$	$< 10^2$	
Zahl T_2r^+/Bakt	$1,6x10^{-3}$	$1,1x10^{-3}$	$< 10^{-5}$	$1,7x10^{-4}$	$< 10^{-5}$	$1,1x10^{-4}$	$< 10^{-6}$	$< 10^{-6}$	

Tab. 5: Übersicht über einen positiven DNS-Infektionsversuch vom Typ $T2r^+$-DNS x T2r-Phage $\longrightarrow$ $T2r^+$-Phage mit E. coli K12(λ)/λ als Wirtszelle. Dieses Resultat ist hinsichtlich der Plaquebildung in den Kontrollen das ungünstigste. Zur Numerierung der Ansätze vgl. Fußnote S. 40. Näheres siehe Textabschnitt 62122. S. 41.

A N S A T Z Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
DNS-Typ im Ansatz:	r^+	r^+	r^+	keine	keine	r	r	r
Experiment I								
a) T_2r^+ Äquivalente DNS:	10^{11}	10^{11}	10^{11}					
b) T_2-Plaquebildung:	$\gtrsim 5\times10^5$	$\gtrsim 5\times10^5$	$\gtrsim 5\times10^5$	$\sim 2{,}1\times10^5$	$\sim 2{,}4\times10^5$	$\sim 4\times10^5$	$\sim 4\times10^5$	-
T_2r^+-Plaquebildung:	$3{,}3\times10^5$	$2{,}3\times10^5$	$2{,}7\times10^5$	< 5	< 5	< 5	2×10^4	-
Experiment II								
a) T_2r^+-Äquivalente DNS:	2×10^{11}	4×10^{10}						
b) T_2-Plaquebildung:	$\gtrsim 7\times10^5$	$\gtrsim 6\times10^5$	-	6×10^4	5×10^4	5×10^4	7×10^4	-
T_2r^+-Plaquebildung:	$6{,}5\times10^5$	$4{,}3\times10^5$	-	$< 10^3$	7×10^4	$\sim 10^3$	$4{,}5\times10^4$	-
Experiment III								
a) T_2r^+-Äquivalente DNS:	2×10^{11}	10^{11}	4×10^{10}					
b) T_2-Plaquebildung:	$8{,}4\times10^5$	7×10^5	$1{,}8\times10^6$	6×10^5	6×10^5	$1{,}2\times10^6$	9×10^5	6×10^5
T_2r^+-Plaquebildung:	5×10^5	$3{,}4\times10^5$	6×10^5	< 5	45	6	$2{,}6\times10^3$	10
Experiment IV								
a) T_2r^+-Äquivalente	2×10^{11}	2×10^{11}						
b) T_2-Plaquebildung:	5×10^5	6×10^5	-	2×10^5	4×10^5	4×10^5	4×10^5	-
T_2r^+-Plaquebildung:	< 5	< 5	-	< 5	< 5	< 5	< 5	-

Tabelle 6, Legende auf Seite 47

Legende zu Tab. 6: Übersicht über die Resultate der drei DNS-Infektionsexperimente vom Typ $T2r^+$-DNS x T2r-Phage -> $\longrightarrow$ $T2r^+$-Phage, die in den DNS-Infektionsansätzen (Spalten 1-3) signifikant stärkere $T2r^+$-Plaquebildung als in den Kontrollen (Spalten 4-8) zeigten. Als Vergleich ein typisches Experiment ohne signifikant unterschiedene Plaquebildung (Experiment IV).

Eingetragen sind a) die Anzahl der als $T2r^+$-DNS eingesetzten $T2r^+$-Phagenäquivalente und b) nach rund dreistündiger Inkubation bei 37°C die Absolutzahlen der T2- und $T2r^+$-Plaquebildung im Ansatz (Indikator E. coli B für T2, E. coli K12(λ)/λ für $T2r^+$). Die Angabe "-" bedeutet, daß ein dritter Ansatz in dem betreffenden Experiment nicht durchgeführt wurde. Die DNS-Präparationen waren frei von infektionstüchtigen T2-Partikeln. - Die Experimente I und II sind im Abschnitt 6212. auf den Seiten 39-41 und in den Tabellen 4, S. 42-43 und 5, S. 44-45 vorgestellt. Näheres vgl. Textabschnitt 6213. auf Seite 41. Zur Numerierung der Spalten vgl. Fußnote S. 40.

Ansatz Nr.	1	2	4	5
DNS-Typ im Ansatz:	r^+	r^+	keine	keine
$T2r^+$-Plaquebildung:				
Experiment a	$1,5x10^3$	-	$2,4x10^2$	-
Experiment b	$1,8x10^3$	$7,4x10^2$	87	$1,2x10^2$
Experiment c	$4,8x10^3$	-	$1,7x10^2$	-

Tab. 7: Beschreibung im Textabschnitt 6213. auf Seite 48. Zur Numerierung der Ansätze vgl. Fußnote S. 40. Angaben in Plaquebildung/Ansatz (Absolutzahlen).

Bevor der in den Experimenten der Tabelle 6 verwendete $T_2r_sh^{+)}$ gewonnen und noch mit $T_2Lrh^{++)}$ gearbeitet wurde, traten in Experimenten des gleichen Typs einige Male unterschiedliche T_2r^+-Plaquebildungen auf, die in Tabelle 7 auf Seite 47 zusammengefaßt sind. Diese Experimente hatten lediglich den Zweck, bei der Suche nach einem erfolgversprechenden Weg Anhaltspunkte zu geben. Deshalb waren Messungen der gesamten T_2-Bildung (mit Indikator E. coli B) nicht durchgeführt worden, ebenfalls keine Kontrollen mit r-DNS und nicht immer doppelte Ansätze. Die Kontrollen der DNS auf infektionstüchtige Phagenpartikel waren einwandfrei.

622. Versuche zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit

Die im Abschnitt 621. beschriebenen positiven Ergebnisse ließen sich nicht öfter reproduzieren, selbst nicht mit identischer DNS-Präparation und identischen Medien. Der im Abschnitt 6211. (S. 38) beschriebene Grundtyp des Versuchs und die im Abschnitt 6212. (S. 39-41) beschriebene Durchführung wurden, um eine sicherere Reproduzierbarkeit zu erreichen, zahlreichen Modifikationen unterworfen, die in diesem Abschnitt in kurzer Form zusammengestellt sind. Vorab sei gesagt, daß alle diese Bemühungen nicht zur Entdeckung des entscheidenden, die Reproduzierbarkeit bestimmenden Parameters geführt haben.

6221. Modifikationen zur Überwindung des Exclusionsproblems[+++)]

Erwünscht war ein Optimalverhältnis zwischen möglichst guter Helferphageninfektion und möglichst geringer Exklusion der später infizierenden DNS. Es wurden darum 1.) die Helferphageninfektion verbessert und 2.) die Exclusionswahrscheinlichkeit verringert oder ganz reduziert.

+) r^+-Reversions-Rate $\leq 10^{-9}$ r^+/r
++) r^+-Reversions-Rate $\sim 10^{-6}$ r^+/r
+++) vgl. Abschnitt 616., S. 33

Zu 1.): Zur Erhöhung der wahren Multiplizität[+)] wurden die Infektionsmultiplizität[++)] erhöht und günstigere Adsorptionsmedien (z.B. Fraser-Medium, TCG-Medium) gewählt. Die Adsorptionszeit wurde verlängert, die Abkühlung auf 0°C durch eine größere Volumen/Oberflächen-Relation und Abschwächung des Schüttelns protrahiert.

Zu 2.):

a) Die Exclusionswahrscheinlichkeit wurde durch Temperaturerniedrigung auf 4°C verringert. Die Adsorptionszeit wurde verkürzt und die Abkühlung durch eine geringe Volumen/Oberflächen-Relation und verstärktes Schütteln beschleunigt.

In Nebenexperimenten[+++)] wurde nach einer Kompromißlösung zwischen den unter 1.) und 2. a) beschriebenen Maßnahmen gesucht. Es ergab sich, daß wegen der Kürze der Exclusionszeit und der relativen Länge der Infektionszeit die erstrebten Optimalbedingungen durch diese Maßnahmen allein nicht erreichbar sind.

b) Die kritische Zeitspanne zwischen Helferphagenzugabe und Abkühlung wurde mit dem Antibiotikum Chloramphenicol überbrückt. Eine Minute vor der Helferphagenzugabe wurden die Bakterien mit Chloramphenicol versetzt und nach der Helferphagenzugabe zum Zwecke einer fast quantitativen Infektion erst nach drei bis fünf Minuten auf 0°C abgekühlt und bei 0°C ST-gewaschen. Nebenexperimente[++++)] hatten gezeigt, daß auf diese Weise die Exclusion eines zweitinfizierenden Phagen vermieden wird.

c) Anstelle der Wirtszelle E. coli K12(λ)/λ wurde die auxotrophe Bakterienmutante E. coli K12 threo$^-$ leu$^-$ thia$^-$(λ)$^-$ zum Zwecke der Exclusionsvermeidung verwendet. Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

+) engl. "multiplicity of infection" ++) engl. "input ratio", zur Erläuterung der Begriffe vgl. (1)

+++) vgl. Abschnitt 616., S. 33-34

++++) vgl. Abschnitt 616., S. 35-37

5 ml einer Übernachtkultur von E. coli K12 threo⁻ leu⁻ thia⁻ (λ)⁻ (Titer 2,5x10^8 Bakt/ml), gewachsen in Aminosäuren - B1 - M9-Medium, wurden auf 100 ml Aminosäuren - B1 - M9-Medium von 37°C überimpft und bei 37°C gut belüftet. Bei einer Dichte von 1..2x10^8 Bakt/ml wurden die Zellen zweimal mit M9-Medium bei Zimmertemperatur gewaschen, in 100 ml M9-Medium resuspendiert und 45 Minuten bei 37°C stark belüftet ("Hungern" zum Zwecke der Erschöpfung des Threonin- Leucin- Thiamin-pools). Sodann wurden sie mit 5 ml einer T_2r-Suspension mit einer Multiplizität von 5 Ph/Bakt infiziert, 2 Minuten bei 37°C belassen, bei Zimmertemperatur oder bei 0°C ST-gewaschen und in Minimal-Medium E oder in vitaminfreiem Medium E mit DNS und 2% Rinderalbumin bei 37°C inkubiert. Nach 10..20 minütiger Inkubationszeit wurden durch Zusatz von Threonin, Leucin und Thiamin+) die Stoffwechselhemmung aufgehoben und die Inkubation zum Zwecke der Phagenneubildung 2 bis 3 Stunden fortgesetzt. In anderen Versuchen waren die essentiellen Faktoren Threonin, Leucin und Thiamin gleich mit Beginn der DNS-Inkubation zugegen (Aminosäuren - B1 - Medium E statt Minimal- und vitaminfreiem Medium E).

6222. Modifikationen der DNS-Aufbereitung

a) Modifikationen, die bereits im Abschnitt 52. "Allgemeine Methoden" auf Seite 19-20 beschrieben sind.

b) Bei der Bereitung des T_2-Phagenstocks wurden durch abermaliges und wiederholtes hoch- und niedertouriges Zentrifugieren und durch Dialysieren weitere Reinigungsschritte eingefügt.

c) Unmittelbar vor der Infektion wurde die DNS kurz auf 55°.. 60°C vorgewärmt.

d) Die Konzentration der DNS im Infektionsansatz wurde über einen weiten Bereich variiert.

+) Endkonzentrationen: Threonin 30 γ/ml, Leucin 30 γ/ml, Thiamin 10 γ/ml

e) Anstelle der normalen, doppelsträngigen DNS wurde hitzedenaturierte einsträngige DNS eingesetzt.

f) Die mittlere Moleküllänge der eingesetzten DNS wurde herabgesetzt

fa) durch verstärkte hydrodynamische Scherung (brüskes Auf- und Abpipettieren, Verwendung englumiger Pipetten und Injektionsnadeln, Verwendung geringtitriger Phagensuspensionen zur Phenolpräparation) oder

fb) durch Vorbehandlung der DNS mit Ultraschall+). Hierbei wurden bis zu 10 unterschiedliche Ultraschalldosen verwendet.

g) Die DNS wurde unter Bedingungen präpariert und behandelt, die nach Hershey (40,11) zu überwiegend ungebrochenen T_2-DNS-Molekülen führen. Es sind dies möglichst geringe hydrodynamische Scherkräfte, die entscheidend durch hohe Viskosität (Konzentration 0,4 mg DNS/ml und höher) sowie durch Verwendung großlumiger Pipetten und durch extrem langsames Pipettieren gewährleistet werden. Bei unseren DNS-Präparationen wurde die Konzentration über die als Minimalwert geforderten 0,4 mg DNS/ml bis zu 2,3 mg DNS/ml gesteigert.

h) Die DNS wurde einer schwachen UV-Bestrahlung ausgesetzt, da UV-Bestrahlung bei Phagen die Rekombinationsfrequenz erhöht (39).

6223. Modifikationen in der Wahl der Wirtsbakterien

Neben E. coli K12(λ)/λ wurden E. coli W3110(λ)/λ, E. coli K12, E. coli K12 threo⁻ leu⁻ thia⁻(λ)⁻ (vgl. S. 49-50), E. coli B und E. coli B/B herangezogen.

6224. Modifikationen in der Behandlung der Wirtsbakterien bis zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion

Systematischen und unsystematischen Variationen wurden unterworfen:

+) Ultraschall erzeugt Brüche in DNS-Doppelhelices (21).

a) Wachstumsmedien der Vorkultur (zusätzlich zu den verschiedenen Medien (vgl. Abschnitt 51., S. 16) auch pH-Wert-Variationen),

b) Art und Alter der Vorkultur (frisch wachsende Kulturen in verschiedenen Stadien der Wachstumskurve, Kulturen in gerade oder schon länger erreichter stationärer Phase der Wachstumskurve, Übernachtkulturen (frische oder ein bis mehrere Tage alte, bei $4^{o}C$ aufbewahrte),

c) die Inoculationsdichte der Hauptkultur,

d) Wachstumsmedien der Hauptkultur (vgl. Abschnitt 51., S. 16-17 einschl. pH-Variationen,

e) Belüftungsstärke der Hauptkultur,

f) Bakterientiterwerte der Hauptkultur zum Zeitpunkt der Helferphageninfektion.

(Wachstumsdauer, Wachstumsgeschwindigkeit, nach der Verdünnung zurückgelegte Generationenzahl, Größe und Beschaffenheit der Bakterienzelle (z.B. Prozentsatz der Begeißelung; Kettenbildung oder Einzelzellen) u. ä. gehen in die genannten Parameter ein).

6225. Modifikationen in der Bakterienvorbehandlung

a) Variationen der ST-Wäsche (Temperatur, pH des Tris-Puffers, Konzentration der Saccharose-Tris-Lösung, Verschiebung der Volumenrelation Saccharose: Tris-Puffer, doppelte Ausführung des Wasserschrittes, Dauer der ST-Wäsche, unterschiedliche Konzentrierung beim letzten Schritt der ST-Wäsche, Einfrieren - Auftauen, statt sofortiger Weiterverwendung vorherige Aufbewahrung bei $0^{o}..4^{o}C$ in der Größenordnung von Stunden bis Tagen, u.a.m.).

b) Umwandlung der E. coli $_{inf.ST}$ in Lysozym-Sphaeroplasten nach der Methode von Hofschneider (45) in zahlreichen Variationen der originalen Methode. Die Umwandlung wurde z.T. in Gegenwart der infizierenden DNS durchgeführt, um mögliche Zwischenstadien von Kompetenz nicht zu verfehlen.

6226. Modifikationen der DNS-Infektions- und Inkubationsbedingungen

a) Variationen aller Bestandteile des Infektionsansatzes, der zeitlichen Aufeinanderfolge der Zusammensetzung des Ansatzes, der Temperatur bei DNS- und Bakterienzugabe (z.B. Medien: Art, Herkunft, Charge, Konzentration der Ingredienzien; Rinderalbumin: verschiedene Lieferanten, Chargen und Konzentrationen; DNS: Zugabe zu verschiedenen Zeiten vor-, gleichzeitig, oder zu verschiedenen Zeiten nach der Bakterienzugabe; Bakterienkonzentration; DNS-Konzentration; Geschwindigkeit der Erwärmung der Bakterien von $0^{o}C$ auf $37^{o}C$; u.a.m.),

b) Variationen der Inkubationsbedingungen:
   ba) Inkubation im Infektionsansatz von 30 Minuten bis zu mehreren Stunden Dauer,
   bb) Verdünnung nach wechselnden Inkubationszeiten in frisches flüssiges Medium und Weiterinkubation,
   bc) Belüftungseffekte durch Schüttelinkubation oder durch Verwendung kleiner Volumina bei großer Oberfläche,
   bd) Plattieren des Infektionsansatzes 5..30 Minuten nach der DNS-Zugabe auf Spezial-Agar (z.B. Saccharose-Soft-Agar mit Rinderalbuminzusatz in vielen Variationen) unter strenger Beachtung einer $37^{o}C$-Temperaturkonstanz (zur Messung der infektiösen Zentren),

   u.a.

Wie schon auf Seite 48 einleitend erwähnt, konnte in diesen Versuchen zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit eine signifikante Plaquebildung durch T_2r^+-Phagen nicht mehr beobachtet werden. Kontrollen zur Prüfung des Indikatorsystems, bei denen verdünnte T_2r^+-Phagensuspensionen bekannten Titers anstelle der Versuchsansätze beziehungsweise deren Verdünnungen plattiert wurden, ergaben in jedem Falle die erwarteten Plaquezahlen. Bei einigen Experimenten wurden Kontrollen derart durchgeführt, daß anstelle der T_2r^+-DNS T_2r^+-Phagen einpipet-

tiert wurden. Diese Phagen wurden nach dem Ende einer einstündigen Inkubationsperiode - wie erwartet - vermehrt wiedergefunden und hatten - wie ebenfalls erwartet - mit den Helferphagen rekombiniert, was durch eine geeignete Mischindikatortechnik+) nachgewiesen werden konnte. In einem Teil der Experimente wurde zusätzlich mit E. coli B auf Plaquebildung durch T_2-Phagen (Komplementation) geprüft. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollansätzen kamen hierbei nicht zur Beobachtung.

623. Andere Versuchsanordnungen

Die Abschnitte 621. und 622. handelten von einer Versuchsanordnung, deren Grundtyp auf Seite 38 beschrieben ist, und ihren Modifikationen. Diese Versuchsanordnung hat eine ausführlichere Darstellung gefunden, weil sie zu positiven Ergebnissen geführt hat. Die im folgenden genannten anderen Versuchsanordnungen haben zu keinem positiven Ergebnis geführt. Sie werden darum nur in ihrem Grundtyp skizziert. Auf die Erwähnung der durchgeführten Modifikationen wird verzichtet; zum größten Teil entsprachen diese ohnehin denjenigen, die im Abschnitt 622. in anderem Zusammenhang aufgeführt sind. Die Kontrollen wurden entsprechend den Kontrollen unter 6211. S. 38-39 angesetzt. Als zusätzliche Kontrolle wurde häufig eine Infektion der verwendeten ST-Zellen und Sphaeroplasten mit ØX174-DNS durchgeführt. Diese Kontrolle zeigte in den allermeisten Fällen eine Kompetenz der Bakterien für ØX174-DNS.

6231. Die Wirtsbakterien wurden ST-gewaschen und erst nach der Wäsche mit Helferphagen und DNS infiziert. Als Helferphagen dienten sowohl HT_2-Partikel++) als auch intakte T_2-Phagen. Die DNS wurde vor der Helferphageninfektion (1,2,3..10..20 bis zu maximal 30 Minuten), gleichzeitig oder nach der Helferphageninfektion zugesetzt.

+) Technik wie bei Abschnitt 612., S. 22 . Der Helferphage T_2r ist in vollständiger Benennung ein T_2rh, der superinfizierende Phage T_2r^+ ein $T_2r^+h^+$.

++) vgl. Abschnitt 613., S. 22 ff.

6232. ST-Zellen nach 6231. (S. 54) wurden in Gegenwart von DNS und Helferphagen (HT_2+), T_2) in Lysozym-Sphaeroplasten nach dem Prinzip von Hofschneider (45) umgewandelt.

6233. Lysozym-Sphaeroplasten nach Hofschneider (45) wurden mit DNS und Helferphagen (HT_2+), T_2) infiziert. Die DNS-Infektion erfolgte vor, gleichzeitig mit, oder nach der Helferphageninfektion.

6234. Statt der Lysozym-Sphaeroplasten nach Hofschneider (45) wurden Lysozym-Sphaeroplasten nach Sinsheimer (34) in Versuchen des Typs 6233. verwendet.

6235. Statt der Lysozym-Sphaeroplasten wurden Penicillin-Sphaeroplasten++) in Versuchen des Typs 6233. herangezogen. Zahlreiche dieser Experimente befolgten exakt die methodischen Vorschriften von van de Pol, Veldhuisen et al. (69,90,91,92).

6236. Einige Experimente wurden mit kältegeschockten Bakterien streng analog der λdg-DNS-Infektion nach Kaiser und Hogness (49) ausgeführt.

6237. Experimente nach 6211. und 6231. bis 6235. wurden auch mit dem Rekombinationssystem T_2h^+-Phage x T_2h-DNS $\longrightarrow$ T_2h-Phage+++) durchgeführt. Hierbei traten T_2h^+-Helferphagen an die Stelle der T_2r-Helferphagen, T_2h-DNS an die Stelle der T_2r^+-DNS, T_2h^+-Kontroll-DNS an die Stelle der T_2r-Kontroll-DNS und als selektiver Indikator E. coli B/2 an die Stelle von E. coli K12(λ)/λ.

+) vgl. Abschnitt 613., S. 22 ff

++) vgl. Abschnitt 614., S. 25 ff

+++) vgl. Abschnitt 432., S. 12

624. Gesamtzahl der durchgeführten Versuche

Insgesamt sind in rund 80 DNS-Infektionsexperimenten rund 700 unterschiedliche Bedingungen erprobt worden. Nicht auswertbare Experimente (Fremdinfektionen mit T_1, T_2, T_3, Proteus, Pilzen und andere Fehlerquellen) sind in dieser Zahl nicht enthalten.

7. Diskussion

71. Diskussion der Versuche mit positiven Ergebnissen

In den DNS-Infektionsversuchen, die in den Abschnitten 6211. bis 6213. (S. 38- 48) beschrieben sind, traten Unterschiede in der Zahl der T_2r^+-Phagen in den Ansätzen mit T_2r^+-DNS (Spalten 1 bis 3 der Tabellen 4, 5, 6, S. 42-43, 44-45, 46) im Vergleich zu den Kontrollansätzen (Spalten 4 bis 12) auf. In den r^+-DNS-Infektionsansätzen fanden sich T_2r^+-Titer zwischen 10^5 und 10^6 T_2r^+/ml. In den Kontrollansätzen streuten die T_2r^+-Titer sehr stark zwischen < 5 T_2r^+/ml und $10^3..10^4$ T_2r^+/ml, im ungünstigsten Einzelfall bis zu 10^5 T_2r^+/ml. Diese Titerunterschiede zwischen DNS-Infektionsansätzen und Kontrollen sind signifikant.

Die starke Streuung in den T_2r^+-Titern der Kontrollen ist erklärlich, da die r^+-Rückmutationsrate im T_2r-Phagenstock bei etwa 10^{-9} r^+/r lag und auch etwa 10^9 T_2r-Helferphagen verwendet wurden. Auf diese Weise konnten gelegentlich T_2r^+-Phagen in den Ansatz und zur Vermehrung gelangen.

Wurde anstelle der T_2r^+-DNS T_2r-DNS verwendet (Spalten 6 bis 8 der Tabellen), ließ sich keine Steigerung der T_2r^+-Plaquebildung beobachten. Damit ist der Einwand widerlegt, daß der

T_2r^+-DNS-Effekt auf nichtgenetische, unspezifische Weise zustandegekommen sei. Ein unspezifisches Zustandekommen des Effektes läge zum Beispiel vor, wenn infolge einer osmotischen Schutzwirkung der DNS die Phagenwurfgröße erhöht würde.

Ein Vergleich mit den Resultaten eines typisch negativen Experiments (Tabelle 6, S. 46, Exp. IV) zeigt den Unterschied zwischen positiv und negativ verlaufenen Versuchen. In negativen Versuchen sank der T_2r^+-Titer in den r^+-DNS-Ansätzen auf die Kontrollwerte ab.

Die Doppel- und Dreifachausführung der Infektions- und Kontrollansätze in ein und demselben Experiment sichert die Resultate gegen zufällige Fremdinfektionen ab. Experimente mit Doppel- bzw. Dreifachansätzen, bei denen nur einer bzw. nur zwei der T_2r^+-DNS-Infektionsansätze signifikant stärkere T_2r^+-Bildung zeigten, kamen nicht vor.

Intakte T_2r^+-Phagen oder noch infektionstüchtige, teilweise abgebaute T_2r^+-Partikel sind als Ursache der beobachteten T_2r^+-Bildung in den T_2r^+-DNS-Infektionsansätzen durch die Kontrollen Nr. 9 und 10 (vgl. Tabellen 4, 5, S. 42-43, 44-45) ausgeschlossen. Nach Inkubation der T_2r^+-DNS-Präparation mit Indikatorbakterien oder in anderen Experimenten mit nicht Helfer-infizierten ST-Zellen waren keine plaquebildenden Einheiten nachzuweisen.

Auf Grund der beobachteten Resultate und der durchgeführten Kontrollen wird geschlossen, daß die Gewinnung freier infektiöser r^+-Gene aus T_2r^+-Bakteriophagen möglich ist. Das Auftreten von T_2r^+-Phagen nach Infektion der Bakterien mit T_2r^+-DNS und T_2r-Phagen ist durch genetische Rekombination zu erklären. Das Phänomen ist analog der genetischen Transformation von Bakterien und kann deshalb auch als "Bakteriophagen-Transformation" bezeichnet werden.

Eine weitergehende Charakterisierung des infektiösen r^+-Gens durch Behandlung mit Nukleasen, Proteasen und T_2-Antiserum konnte infolge der schwierigen Reproduzierbarkeit des Effektes

nicht erfolgen. Streng genommen darf also der chemische Begriff "T_2r^+-DNS" mit dem hier biologisch wirksamen Prinzip noch nicht identifiziert werden. Man muß ihn vorläufig durch den biologischen Begriff "freies infektiöses r^+-Gen" oder den methodischen Begriff "phenol-deproteinisierte T_2r^+-Phagensuspension" ersetzen. Jedoch hat das hier angewandte Phenolverfahren bei zahlreichen anderen Viren und Phagen zu infektiösen Nukleinsäuren geführt, deren Infektiosität gegen Nukleasen empfindlich und gegen Proteasen und Antiseren unempfindlich war (73,82,38,55,15,[illegible],[illegible],[illegible],89,90,91,92,[illegible],24,25,[illegible],46,58). Im Hinblick darauf kann bei dem vorliegenden freien infektiösen r^+-Gen eine Empfindlichkeit gegen DNase und eine Unempfindlichkeit gegen Proteasen und T_2-Antiserum mit hoher Wahrscheinlichkeit erwartet werden. Der Proteingehalt von zweimal Phenol-extrahierter T_2-DNS liegt, gemessen mit S^{35}-Markierungen, bei 0,1% (63).

In vielen Arbeiten über infektiöse Nukleinsäuren wurde als quantitatives Maß für die Infektiosität einer Nukleinsäure die Zahl der infektiösen Zentren angegeben. Dies ist hier nicht der Fall, denn die in den positiven Experimenten beobachtete T_2r^+-Plaquebildung ist ein gegenüber der Zahl der infektiösen Zentren verstärkter Effekt, der sich aus dem Durchlaufen eines oder mehrerer Vermehrungszyklen während der mehrstündigen Inkubationsperiode im flüssigen Medium erklärt. Ein solcher "Verstärkereffekt" wurde beabsichtigt, weil er das Erkennen positiver Reaktionen erleichtert.

Die Unterschiede in der T_2-Plaquebildung in den DNS-Infektionsexpeditzen und Kontrollen der Experimente I und II der Tabelle 6 auf Seite 46 verhalten sich bis zum Verhältnis von 10:1. Sie dürften darauf hinweisen, daß das infektiöse r^+-Gen nicht nur im Sinne einer genetischen Rekombination, sondern auch im Sinne einer funktionellen Komplementation gewirkt hat. Die sichere Beurteilung der Komplementation ist schwierig, weil

ein selektives Nachweissystem, wie es für T_2r^+-Phagen im Indikator E. coli K12(λ)/λ vorhanden ist, fehlt. Darum ist eine Unterscheidung der nachzuweisenden, neugebildeten T_2r-Phagen von unadsorbiert gebliebenen T_2r-Helferphagen nicht möglich.

72. Diskussion der geringen Ausbeute und der schwierigen Reproduzierbarkeit

Die erzielten positiven Ergebnisse sind, gemessen an Ausbeute und Reproduzierbarkeit in anderen Systemen infektiöser Nukleinsäuren, nicht befriedigend. Die Gründe hierfür können in prinzipiellen Besonderheiten des verwendeten experimentellen Systems und in unüberwundenen technischen Schwierigkeiten liegen. Sie werden im folgenden diskutiert.

721. Prinzipielle Besonderheiten des experimentellen Systems

Einführend sei an die außergewöhnliche Länge des T_2-DNS-Moleküls erinnert. T_2 ist - neben T_4 - der größte Phage, aus dem bisher die Isolierung einer infektiösen Nukleinsäure versucht worden ist. Die außergewöhnliche Größe wird in besonderen Messungen zwei Vergleiche veranschaulicht: 1) Das T_2-DNS-Fadenmolekül ist mit 50 μ Länge annähernd länger als das zu infizierende Bakterium. 2) Allein die r-Region des T_2, die sich in der Genkarte umfaßt, ist mit einer wahrscheinlichen DNS-Länge von 50 μ · 0,02 = 1 μ beispielsweise um einen Faktor von 10 länger als die infektiöse DNS des g e s a m t e n ØX174, die 0,1 μ (45) mißt.

Zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines positiven Effektes im vorliegenden System müssen folgende Einzelwahrscheinlichkeiten miteinander multipliziert werden:

1) Die Penetrationswahrscheinlichkeit eines DNS-Fragments in ein Bakterium,
2) die Wahrscheinlichkeit, mit welcher der r^+-Locus bzw. h-Locus im penetrierten Fragment enthalten ist,

3) die Helferphagen-Superinfektionswahrscheinlichkeit,
4) die Exclusionswahrscheinlichkeit,
5) die Rekombinationswahrscheinlichkeit und
6) die Wahrscheinlichkeit der Neubildung von reifen Phagen aus dem rekombinierten Genom.

Zu 1) Eine quantitative Aussage läßt sich nicht treffen. Über den molekularen Mechanismus der Einschleusung freier DNS in Bakterien ist nichts bekannt. Wenn Diffusion eine wesentliche Rolle spielt, ist die Penetrationswahrscheinlichkeit umso größer, je geringer die mittlere Moleküllänge der eingesetzten DNS ist - und umgekehrt. Im vorliegenden System kommt als Besonderheit hinzu, daß T_2-DNS einen bis zwei Glucosereste am Hydroxymethylcytosin trägt, die - sterisch gesehen - die Penetration erschweren könnten.

Zu 2) Eine quantitative Aussage ist ebenfalls nicht möglich. Die Wahrscheinlichkeit 2) verhält sich proportional zur Länge des DNS-Fragments und damit unglücklicherweise umgekehrt proportional zur Wahrscheinlichkeit 1).

Beim Brechen eines DNS-Fadenmoleküls durch hydrodynamische Scherkräfte treten Zonen gehäufter Bruchwahrscheinlichkeit auf. Diese liegen bei Primärbrüchen in der Molekülmitte, bei Sekundärbrüchen wiederum in der Mitte der Primärfragmente und so fort (10). So könnten einzelne Gene, deren Locus in den Zonen gehäufter Bruchwahrscheinlichkeit läge, durch Bruchereignisse selektiv zerstört werden. Diese Gefahr scheidet indes für das System der vorliegenden Arbeit aus, da T_2-DNS, die mit der Phenolmethode präpariert wurde, eine zirkulär permutierte Genomstruktur aufweist (88). Dies bedeutet, daß in den Zonen der gehäuften Bruchwahrscheinlichkeit von Molekül zu Molekül ein anderer Genlocus liegt, so daß sich die Bruchstellen statistisch auf die Genkarte verteilen.

Zu 3) Eine hohe Helferphagen-Superinfektionswahrscheinlichkeit bildete bei einem Teil von Experimenten, zum Beispiel denen mit HT_2-Helferinfektion, ein wesentliches prinzipielles Problem, da infektionstüchtige HT_2 nur in geringen Titern herstellbar sind. In solchen Experimenten lag die Superinfektionswahrscheinlichkeit von vornherein um zwei und mehr Zehnerpotenzen unter 1 .

Zu 4) Das Phänomen der mutuellen Exclusion ist eine Eigenart von T_2, die Rekombinationsexperimente kompliziert, bei denen die Infektion durch die Elternpartikel nicht gleichzeitig erfolgt. Gleichzeitige Infektion ist ein Problem bei Systemen, in denen ein Helferphage einmal auf Grund spezifischer Adsorptionseinrichtungen ein Bakterium wesentlich schneller findet und zweitens auf Grund eines aktiven Mechanismus seine DNS rasch ins Bakterium injiziert und in denen der Rekombinationspartner, ein freies, sperriges DNS-Fadenmolekül, seinen Weg wahrscheinlich passiv durch Diffusion finden muß.

Das Exclusionsproblem entfällt beispielsweise in Transformationssystemen beim Phagen λ , da λ-infizierte Zellen einen superinfizierenden λ während der Latenzperiode nicht excludieren (52).

Zu 5) Der Nachweis eines infektiösen Gens setzt in den verwendeten selektiven Systemen genetische Rekombination voraus. Es liegt auf der Hand, daß zur Erzielung eines infektiösen d.h. rekombinativen Zentrums umso mehr infektiöse r^+-Gene bzw. h-Gene eingeführt werden müssen, je geringer die Rekombinationsfrequenz ist. Über die Höhe dieser Rekombinationsfrequenz läßt sich nichts aussagen, da unbekannt ist, ob DNS-Fragmente besser oder schlechter rekombinieren als intakte Phagen.

Sofern die Hypothese zutrifft, daß zur Ausführung einer Rekombination ganze DNS-Moleküle oder große Molekülabschnitte sich paaren, sich überlappen oder sonstwie in

eine geordnete Beziehung zueinander treten müssen (vgl. das "mating"-Modell der genetischen Rekombination (93,1,83)), könnten fragmentierte DNS-Moleküle kein "mating" mehr durchführen und nicht mehr rekombinieren. Die Schwierigkeit bestünde in diesem Fall darin, daß eine für Rekombination günstige Moleküllänge für Penetration bereits zu groß wäre.

Jedoch erlaubt eine andere Hypothese - die der partiellen Replikation (9,1,83) - für genetische Rekombination die Annahme einer geringeren minimalen DNS-Molekülgröße als das "mating"-Modell. Rekombinationsoptimum und Penetrationsoptimum könnten sich in diesem Falle günstiger zueinander verhalten.

Zu 4. Die Wahrscheinlichkeit der Neubildung von reifen Phagen aus dem rekombinierten Genom ist umso geringer, je stärker die Bakterien als Folge der Vorbehandlungsverfahren geschädigt worden sind - und umgekehrt. Im vorliegenden System ist zu berücksichtigen, daß T_2 nicht nur ein außergewöhnlich großes, sondern auch ein außergewöhnlich komplex gebautes Gebilde ist. Dementsprechend aufwendig und dementsprechend gegen Schädigungen anfällig muß der Synthesemechanismus des T_2 sein.

Bei den spezifischen Schwierigkeiten des vorliegenden Systems wäre weiter an eine mögliche Bedeutung der Spurenstoffe im Phagenkopf zu denken, die eine eventuelle Überstruktur der DNS stabilisieren könnten (29) und bei einer normalen Infektion mit ins Bakterium injiziert werden (52).

T_2 zeigt erhebliche Unterschiede in der Wechselwirkung zwischen Phage und Wirtszelle im Vergleich zu anderen Phagen, aus denen sich leichter infektiöse Nukleinsäuren isolieren ließen. Die DNS des Phagen T_2 ist von der der Wirtszelle grundsätzlich verschieden dadurch, daß sie an Stelle des Cytosins glucosyliertes 5-Hydroxymethylcytosin enthält (1).

Andere Phagen als die geradzahligen T-Phagen weisen in ihrer DNS keine qualitativen Unterschiede gegenüber der DNS der Wirtszelle auf. T_2-infizierte Bakterien zeigen unmittelbar nach der Infektion starke zytologische Veränderungen (61), während λ keine sichtbaren Veränderungen in der Zelle provoziert (50). T_2 unterbricht bei Infektion die DNS-Eigensynthese seines Wirts, bei λ und ØX174 schreitet diese bis zur Lyse fort (1,83,52,48). λ dg (49) ist ein temperierter Phage, was auf eine sehr nahe Verwandtschaft zum genetischen System der Wirtszelle hinweist. – Der Verwandtschaftsgrad zwischen Phage und Wirtszelle könnte durchaus von Einfluß sein für die Entlebung zwischen infektiöser Nukleinsäure und Wirtszelle.

Erinnert sei zuletzt auch daran, daß Colibakterien sich noch nie mit Bakterien-DNS transformieren ließen, was auf eine prinzipielle Schwierigkeit auf der Bakterienseite des T_2-DNS-Coli-Systems hindeuten könnte.

722. Technische Probleme

7221. Die DNS

Im folgenden sind die Modifikationen der DNS-Aufbereitung, wie sie im Abschnitt 6222. auf den Seiten 50-51 genannt sind, diskutiert.

Die angewandte Methode zur Bereitung des Phagenstocks und zur Phenolpräparation führt, wenn sie mit ØX174 durchgeführt wird, sicher reproduzierbar zu biologisch aktiver DNS (43,45,48). Bei T_2 war dies nicht der Fall. Als Ursache konnte DNase-Wirkung vermutet werden, obwohl ein Viskositätsabfall der DNS, bei einer der Präparationen selbst nach über einem Jahr Aufbewahrungszeit (4°C), nie eingetreten ist. Auf jeden Fall wurden die weiteren Reinigungsschritte eingefügt, um eventuell doch noch vorhandene DNase und divalente Kationen, die DNase aktivieren, zu beseitigen.

DNS in Lösungen hoher Konzentration neigt zu einer unspezifischen Assoziation (72), die eine Infektiosität verhindern könnte. Durch kurzzeitiges Vorwärmen der DNS (72) und/oder durch stärkeres Verdünnen wurde dieser Assoziation entgegengewirkt.

Daß mit einsträngiger DNS eher als mit doppelsträngiger ein positives Ergebnis erzielt werden könnte, ist auf Grund der Erfahrungen mit ØX174 denkbar. Bei ØX174-DNS ist unter bestimmten Bedingungen nur das einsträngige, nicht jedoch das doppelsträngige Replikativ-Stadium infektiös (45,48,6), was durch die unterschiedliche Sekundärstruktur der beiden Formen erklärt werden könnte. Es ist grundsätzlich nicht ausgeschlossen, daß einsträngige T_2-DNS genetische Information enthält, obwohl T_2-DNS normalerweise einen Doppelstrang bildet. Denn mit hitzedenaturierter einsträngiger Bakterien-DNS sind genetische Bakterientransformationen durchgeführt worden (70).

Die Ultraschallbehandlung setzte die mittlere Moleküllänge der eingesetzten DNS herab. Sie sollte die Penetration erleichtern. Die zahlreichen unterschiedlichen Dosen wurden verwendet, um möglichst jenen Optimalfall zu erfassen, bei dem einerseits die mittlere Moleküllänge für die Penetration ins Bakterium hinreichend klein, andererseits die Konzentration an intakt gebliebenen und rekombinationsfähigen r^+-Loci hinreichend groß sei.

Unter der Annahme des "mating"-Modells der genetischen Rekombination (vgl. S.62) wäre denkbar, daß bereits die normale Phenolpräparation die DNS in rekombinationsunfähige, weil zu kleine Fragmente zerschlägt. Aus diesem Grunde wurde mit weitgehend ungebrochenen T_2-DNS Molekülen gearbeitet.

Schwache UV-Dosen wurden appliziert, weil UV-Bestrahlung auf Bakteriophagen die Rekombinationsfrequenz in Phagenkreuzungen erhöht (39). Ein analoges Phänomen wäre für das System der vorliegenden Arbeit denkbar.

7222. Die Kompetenz der Bakterien

Sie bildet nach anderen Erfahrungen mit infektiösen Nukleinsäuren ein sehr wesentliches, oft entscheidendes Problem. Alle in der Literatur genannten kritischen Parameter (55,15, 35,43,94,34,77,49,69,90,91,65,24,25,54,46,68) und zahlreiche weitere Faktoren sind in den Experimenten der vorliegenden Arbeit berücksichtigt worden. In den Abschnitten 6223. bis 6226. auf den Seiten 51- 53 sind sie genannt. Wie Kontrollen gezeigt haben (S. 54), waren ST-Zellen und Sphaeroplasten für ØX174-DNS kompetent, die im gleichen Experiment für T_2-DNS nicht kompetent waren.

Alle Kenntnisse über Kompetenz sind empirischer Natur. Eine molekularbiologische Deutung des Phänomens fehlt. Erzielung von Kompetenz ist bisher nur nach dem Prinzip von Versuch und Irrtum möglich, wodurch planvolles Experimentieren sehr erschwert wird.

Zudem sind Kompetenz-Systeme äußerst störungsanfällig. Geringfügige Änderungen der kritischen Parameter führen zu Unterschieden in den Ergebnissen, die sich über mehrere Zehnerpotenzen erstrecken können (Lit. s. oben). Daraus darf geschlossen werden, daß bereits nicht mehr registrierbare Veränderungen der Bedingungen von Einfluß auf das Ergebnis sind. Die Vorarbeiten zu den Experimenten mit Penicillin-Sphaeroplasten (Abschnitt 614, S. 25- 30) veranschaulichen die Subtilität, mit der in Sphaeroplasten-Systemen gearbeitet werden muß.

Exclusion als mögliche Ursache mangelhafter Kompetenz wurde durch geeignete technische Verfahren (vgl. Abschnitt 6221., S. 48- 50) und durch geeignete Kontrollen (vgl. Seite 53-54) mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. In einigen Versuchsanordnungen, die in den Abschnitten 6231. bis 6236. auf den Seiten 54-55 beschrieben sind, war die Exclusionsgefahr geringer, da die Infektion mit DNS und Helferphagen gleichzeitig erfolgen konnte. Zudem wurde in vielen dieser Experi-

mente der DNS ein zeitlicher Vorsprung vor den Helferphagen gegeben, um unterschiedliche Invasionsgeschwindigkeiten auszugleichen.

Die Umwandlung von ST-Zellen in Lysozym-Sphaeroplasten in Gegenwart von DNS sollte eventuell kompetente Zwischenstufen erfassen.

7223. Die Helferinfektion mit HT_2.

HT_2 als Helferpartikel wurden in anderen als denjenigen Experimenten, die sich an van de Pol, Veldhuisen et al. (69,90, 91,92) anlehnten, nur solange verwendet, bis eigene Versuche+) unter Verwendung eines empfindlichen Nachweissystems die Infektionsfähigkeit von Sphaeroplasten durch intakte T_2-Phagen bewiesen hatten. HT_2 sind zwar infektionsfähig für Sphaeroplasten, aber nur in geringen Titern herstellbar, so daß a priori die Wahrscheinlichkeit einer ausreichenden Helferphageninfektion und damit die Erfolgsaussichten herabgemindert sind.

+) vgl. Abschnitt 615., S. 30

8. Zusammenfassung

Es war die Aufgabe gestellt, DNS-Äquivalente einzelner Gene des Bakteriophagen T_2 in freier infektiöser Form zu gewinnen. Die Gewinnung freier infektiöser r^+-Gene ist gelungen. Das Phänomen, mit dem der Nachweis dieses Ergebnisses geführt wurde, ist der genetischen Transformation bei Bakterien analog. Das Resultat der vorliegenden Arbeit kann darum auch als "Bakteriophagen-Transformation" bezeichnet werden.

Freie DNS lieferte die Phenolmethode nach Schuster, Schramm und Zillig (73). Die Wirtsbakterien wurden zur Erzielung von Kompetenz verschiedenen Präparationsverfahren unterworfen. Zum Nachweis einer Infektiosität der DNS wurden zwei Rekombinationssysteme und ein Komplementationssystem entwickelt:

1) Wirtsbakterien wurden mit DNS aus T_2r^+-Phagen infiziert und mit intakten T_2r-Phagen, sogenannten "Helferphagen", superinfiziert. Eine Infektiosität der T_2r^+-DNS ist nachgewiesen, wenn infolge genetischer Rekombination mit dem T_2r-Helfergenom T_2r^+-Phagen in der Phagennachkommenschaft auftreten. Nach solchen wurde mit Hilfe der Indikatorbakterien E. coli K12(λ)/λ selektiv gesucht.

2) Wirtsbakterien wurden mit DNS aus T_2h-Phagen infiziert und mit T_2h^+-Helferphagen superinfiziert. Nach Rekombinanten des Typs T_2h wurde mit den Indikatorbakterien E. coli B/2 selektiv gesucht.

3) Wirtsbakterien vom Colityp K12(λ)/λ wurden mit DNS aus T_2r^+-Phagen infiziert und mit T_2r-Helferphagen superinfiziert. T_2-Titervergleiche mit Kontrollansätzen prüften, ob die T_2r-Phagen infolge funktioneller Komplementation in E. coli K12(λ)/λ reifen konnten, was nur bei Anwesenheit eines r^+-Gens möglich wäre.

Signifikant positive und spezifische Resultate wurden mit dem System 1) in drei DNS-Infektionsversuchen erzielt. Die Wirtsbakterien E. coli K12(λ)/λ waren durch aufeinanderfolgende wasche in destilliertem Wasser und hypertonischem saccharose-Tris-

(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer osmotisch vorbehandelt worden. In den r^+-DNS-Infektionsansätzen fanden sich T_2r^+-Titer zwischen 10^5 und 10^6 T_2r^+/ml. In den Kontrollansätzen streuten die T_2r^+-Titer sehr stark zwischen < 5 T_2r^+/ml und $10^3..10^4$ T_2r^+/ml, im ungünstigsten Einzelfall bis zu 10^5 T_2r^+/ml. Diese Streuung ist durch T_2r^+-Rückmutanten im T_2r-Helferphagenstock erklärbar. Der erzielte T_2r^+-Titer bezeichnet nicht die infektiösen Zentren, sondern die Phagennachkommenschaft nach dem Durchlaufen eines oder mehrerer Vermehrungszyklen. An Wirtszellen wurden $3..6x10^8$ Bakterien/ml eingesetzt. Die Infektionsmultiplizitäten betrugen 100 bis 500 T_2r^+-Äquivalente DNS und 4 bis 6 T_2r-Helferphagen pro Bakterium.

Mit dem System 3) wurden Hinweise auf positive Resultate und mit dem System 2) keine positiven Ergebnisse erzielt. Insgesamt wurden rund 80 DNS-Infektionsversuche unter rund 700 verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

Im Vergleich zu anderen Systemen infektiöser Nukleinsäuren ist das Ergebnis hinsichtlich Ausbeute und Reproduzierbarkeit nicht befriedigend. Prinzipielle und technische Schwierigkeiten des T_2-Coli-Systems und der verwendeten Nachweissysteme, die einer guten Ausbeute und einer sicheren Reproduzierbarkeit entgegenstehen, werden eingehend diskutiert.

Literaturverzeichnis

(1) Adams, M.H.: Bacteriophages, New York - London 1959

(2) Barricelli, N.A., A.H. Doerman: An Analytical Approach to the Problems of Phage Recombination and Reproduction III. Cross Reactivation; Virol. 13, 460 (1961)

(3) Benzer, S.: Fine Structure of a Genetic Region in Bacteriophage; Proc. Natl. Acad. Sci. 41, 344 (1955)

(4) Benzer, S.: The Elementary Units of Heredity; in: The Chemical Basis of Heredity, Baltimore 1957, p. 70

(5) Benzer, S.: On the Topology of the Genetic Fine Structure; Proc. Natl. Acad. Sci. 45, 1607 (1959)

(6) Benzinger, R., P.H. Hofschneider: Biological Melting Curves for the "Replicative Form" of ØX174 DNA; Z. Vererbungsl. 94, 316 (1963)

(7) Benzinger, R.: TCG-Medium, persönliche Aufzeichnungen aus einem Phagenkurs an der Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, 1960

(8) Brenner, S., G. Streisinger, R.W. Horne, S.P. Champe, L. Barnett, S. Benzer, M.W. Rees: Structural Components of Bacteriophage; J. Mol. Biol. 1, 281 (1959)

(9) Bresch, C.: Replication and Recombination in Bacteriophage - A Review of Pertinent Data and a Molecular Interpretation of the Partial Replica Hypothesis; Z. Vererbungsl. 93, 476 (1962)

(10) Burgi, E., A.D. Hershey: A Relative Molecular Weight Series Derived from the Nucleic Acid of Bacteriophage T_2; J. Mol. Biol. 3, 458 (1961)

(11) Burgi, E., A.D. Hershey: Specifity and Concentration Limit in Self-Protection against Mechanical Breakage of DNA; J. Mol. Biol. 4, 313 (1962)

(12) Burnet, F.M., W.M. Stanley eds.: The Viruses, Vol. 2: Plant and Bacterial Viruses; New York - London 1959

(13) Burton, K.: The Relation between the Synthesis of Deoxyribonucleic Acid and the Synthesis of Protein in the Multiplication of Bacteriophage T_2; Biochem. J. 61, 473 (1955)

(14) Cairns, J.: An Estimate of the Length of the DNA Molecule of T_2 Bacteriophage by Autoradiography; J. Mol. Biol. 3, 756 (1961)

(15) Colter, J.S., K.A.O. Ellem: Interaction of Viral Nucleic Acids with Mammalian Cells; Fed. Proc. 20, 650 (1961)

(16) Davison, P.F.: The Effect of Hydrodynamic Shear on the Deoxyribonucleic Acid from T_2 and T_4 Bacteriophages; Proc. Natl. Acad. Sci. 45, 1560 (1959)

(17) Davison, P.F., D. Freifelder, R. Hede, C. Levinthal: The Structural Unity of the DNA of T_2 Bacteriophage; Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 1123 (1961)

(18) Demerec, M., U. Fano: Genetics 30, 119 (1945), zit. nach (1)

(19) Denés, G., L. Polgár: T_2 Phage Infection of "Protoplasts" obtained by Penicillin Treatment of Escherichia coli B; Nature 183, 696 (1959)

(20) Dische, Z.: Color Reactions of Nucleic Acid Components; in: E. Chargaff, J.N. Davidson eds., The Nucleic Acids, New York 1955, Vol. I, p. 285

(21) Doty, P., B.B. McGill, S.A. Rice: The Properties of Sonic Fragments of Deoxyribose Nucleic Acid; Proc. Natl. Acad. Sci. 44, 432 (1958)

(22) Doty, P., J. Marmur, J. Eigner, C. Schildkraut: Strand Separation and Specific Recombination in Deoxyribonucleic Acids: Physical Chemical Studies; Proc. Natl. Acad. Sci. 46, 461 (1960)

(23) Dulbecco, R.: Mutual Exclusion between Related Phages; J. Bacteriol. 63, 209 (1952)

(24) Evans, E.A., R.P. Mackal, L. Coleman: Infection of Protoplasts with DNA from the Virulent Bacteriophage T1; Fed. Proc. 21, 456 (1962)

(25) Fouace, J., J. Huppert: Infection des sphéroplastes bactériens par l'acide ribonucléique phagique. Méthode d'isolement et d'identification des phages par leurs acides nucléiques; Comptes Rendus Acad. Sciences 254, 4387 (1962)

(26) Fraenkel-Conrat, H.: The Role of the Nucleic Acid in the Reconstitution of Active Tobacco Mosaic Virus; J. Am. Chem. Soc. 78, 882 (1956)

(27) Fraser, D., E.A. Jerrel: The Amino Acid Composition of T_3 Bacteriophage; J. Biol. Chem. 205, 291 (1953)

(28) Fraser, D., H.R. Mahler, A.L. Shug, C.A. Thomas Jr.: The Infection of Sub-Cellular Escherichia coli, Strain B, with a DNA Preparation from T_2 Bacteriophage; Proc. Natl. Acad. Sci. 43, 939 (1957)

(29) Fraser, D., H.R. Mahler: Effects of Diamines on the Protoplast-Infecting Agent Derived from T_2 Bacteriophage; J. Am. Chem. Soc. 80, 6456 (1958)

(30) Frédéricq, P.: Emploi du chloroforme pour mesurer le taux de fixation des entérobactériophages par les bactéries vivantes; Comptes Rendus Soc. Biol. 146, 327 (1952)

(31) Garen, A.: Physiological Effects of rII Mutations in Bacteriophage T_4; Virol. 14, 151 (1961)

(32) Gierer, A., G. Schramm: Die Infektiösität der Nukleinsäure aus Tabakmosaikvirus; Z. Naturforschg. 11b, 138 (1956)

(33) Gierer, A., G. Schramm: Infectivity of Ribonucleic Acid from Tobacco Mosaic Virus; Nature 177, 702 (1956)

(34) Guthrie, G.D., R.L. Sinsheimer: Infection of Protoplasts of Escherichia coli by Subviral Particles of Bacteriophage ØX174; J. Mol. Biol. 2, 297 (1960)

(35) Herriot, R.M.: Infectious Nucleic Acids, a New Dimension in Virology; Science 134, 256 (1961)

(36) Hershey, A.D., M. Chase: Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage; J. Gen. Physiol. 36, 39 (1952)

(37) Hershey, A.D.: Bacteriophages as Genetic and Biochemical Systems; Adv. Virus Res. 4, 25 (1957)

(38) Hershey, A.D., N.E. Melechen: Synthesis of Phage-Precursor Nucleic Acid in the Presence of Chloramphenicol; Virol. 3, 207 (1957)

(39) Hershey, A.D., E. Burgi, G. Streisinger: Genetic Recombination between Phages in the Presence of Chloramphenicol; Virol. 6, 287 (1958)

(40) Hershey, A.D., E. Burgi: Molecular Homogeneity of the Deoxyribonucleic Acid of Phage T_2; J. Mol. Biol. 2, 143 (1960)

(41) Hofschneider, P.H.: Plaque-forming Ability of Urea- or Phenol-treated T_2 Coli-Phage Preparations; Nature 186, 330 (1960)

(42) Hofschneider, P.H.: T_1 and λ Phage Adsorption on Protoplast-like Bodies of Escherichia coli; Nature 186, 568 (1960)

(43) Hofschneider, P.H.: Über ein infektiöses Desoxyribonukleinsäure-Agens aus dem Phagen ØX174; Z. Naturforschg. 15b, 441 (1960)

(44) Hofschneider, P.H.: Zur Wandstruktur von E. coli B Sphaeroplasten; Proc. Eur. Reg. Conf. on Electron Microscopy, Delft 1960, Vol. II, 1028

(45) Hofschneider, P.H.: Versuche zur Isolierung infektiöser Substrukturen und des infektiösen Prinzips aus Bakteriophagen; Habilitationsschrift München 1962

(46) Hofschneider, P.H.: Untersuchungen über "kleine" E. coli K12 Bakteriophagen; Z. Naturforschg. 18b, 203 (1963)

(47) Hofschneider, P.H., K. Müller-Jensen: Über infektiöse Substrukturen aus E. coli Bakteriophagen, 3. Mitt.: Nachweis und Eigenschaften der "HT_2"-Partikel; Z. Naturforschg. 18b, 922 (1963)

(48) Hofschneider, P.H., R. Benzinger, H. Delius: persönliche Mitteilungen und unveröffentlichte Ergebnisse, 1961-1963

(49) Kaiser, A.D., D.S. Hogness: The Transformation of Escherichia coli with Deoxyribonucleic Acid isolated from Bacteriophage λ dg; J. Mol. Biol. 2, 392 (1960)

(50) Kellenberger, E.: Les formes caractéristiques des nucleoides de E. coli et leurs transformations dues à l'action d'agents mutagènes-inducteurs et de bactériophages; in: Bacterial Cytology, Symp. 6th Congr. Int. Microbiol. Rome 1953, p. 45

(51) Kellenberger, E.: Aufbau, Wirkung und Vermehrung der Bakteriophagen; Nova Acta Leopoldina, N.F. 19, 55 (1957)

(52) Kellenberger, E.: Vegetative Bacteriophage and the Maturation of the Virus Particles; Adv. Virus Res. 8, 1 (1961)

(53) Kleinschmidt, A.K., D. Lang, D. Jacherts, R.K. Zahn: Darstellung und Längenmessungen des gesamten Desoxyribonucleinsäure-Inhaltes von T_2-Bakteriophagen; Biochim. Biophys. Acta 61, 857 (1962)

(54) Knolle, P., F. Kaudewitz: Factors Affecting the Plaque-Yield Resulting from Infection of E. coli K12 Protoplasts by Phenol Extracts of the RNA-Phage ft5; Biochem. Biophys. Res. Comm. 9, 208 (1962)

(55) Kozloff, L.M.: Biochemistry of Viruses; Annual Review Biochem. 29, 475 (1960)

(56) Lederberg, J.: Bacterial Protoplasts Induced by Penicillin; Proc. Natl. Acad. Sci. 574 (1956) 42

(57) Lederberg, J., J.St. Clair: Protoplasts and L-Type Growth of Escherichia coli; J. Bact. 75, 143 (1958)

(58) Levinthal, C., P.F. Davison: Degradation of Deoxyribonucleic Acid under Hydrodynamic Shearing Forces; J. Mol. Biol. 3, 674 (1961)

(59) Liebermeister, K., E. Kellenberger: Studien zur L-Form der Bakterien; Z. Naturforschg. 11b, 200 (1956)

(60) Lorek, H., P.H. Hofschneider: in Vorbereitung

(61) Luria, S.E., M.L. Human: Chromatin Staining of Bacteria during Bacteriophage Infection; J. Bact. 59, 551 (1950)

(62) Mahler, H.R., D. Fraser: Studies in Partially Resolved Bacteriophage-Host Systems. IV. Some Properties of the Protoplast-Infecting Agent Derived from T_2 Bacteriophage. Virol. 8, 401 (1959)

(63) Mandell, J.D., A.D. Hershey: A Fractionating Column for Analysis of Nucleic Acids; Analyt. Biochem. 1, 66 (1960)

(64) Melechen, N.E.: Relationship of Phage DNA Synthesis to Protein Synthesis in Replication of Bacteriophage T_2; Genetics 40, 585 (1955)

(65) Meyer, F., R.P. Mackal, M. Tao, E.A. Evans Jr.: Infectious Deoxyribonucleic Acid from λ Bacteriophage; J. Biol. Chem. 236, 1141 (1961)

(66) Müller-Jensen, K.: unveröffentlicht

(67) Nomura, M.: DNA Synthesized in E. coli K12(λ) after Infection with an rII Mutant of Bacteriophage T_4; Virol. 14, 164 (1961)

(68) Paranchych, W.: Assay of Infectious RNA from Bacteriophage R17; Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 28 (1963)

(69) Pol, J.H.van de, G. Veldhuisen, J.A. Cohen: Phage Transformation: A New Criterium for the Biological Activity of Bacteriophage DNA; Biochim. Biophys. Acta 48, 417 (1961)

(70) Robison, M., W.R. Guild: Evidence for Message Reading from a Unique Strand of DNA; Fed. Proc. 22, 643 (1963)

(71) Rubenstein, I., C.A. Thomas Jr., A.D. Hershey: The Molecular Weights of T_2 Bacteriophage DNA and its First and Second Breakage Products; Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 1113 (1961)

(72) Sadron, C., J. Pouyet: Sympos. Makromolek. Stoffe Zürich 1958, zit. nach Angew. Chem. 71, 83 (1959)

(73) Schuster, H., G. Schramm, W. Zillig: Die Struktur der Ribonukleinsäure aus Tabakmosaikvirus; Z. Naturforschg. 11b, 339 (1956)

(74) Séchaud, J., E. Kellenberger: Lyse précoce, provoquée par le chloroforme, chez les bactéries infectées par du bacteriophage; Ann. Inst. Pasteur 90, 102 (1956)

(75) Sekely, L.I.: Mapping Experiments with Bacteriophage T_2L; Virol. 12, 118 (1960)

(76) Sekiguchi, M.: Inactivation of Urea-Disrupted Phage by Proteinases; Virol. 6, 777 (1958)

(77) Sekiguchi, M., A. Taketo, Y. Takagi: An Infective Deoxyribonucleic Acid from Bacteriophage ØX174; Biochim. Biophys. Acta 45, 199 (1960)

(78) Sinsheimer, R.L.: Purification and Properties of Bacteriophage ØX174; J. Mol. Biol. 1, 37 (1959)

(79) Sinsheimer, R.L.: A Single-Stranded Desoxyribonucleic Acid from Bacteriophage ØX174; J. Mol. Biol. 1, 43 (1959)

(80) Sinsheimer, R.L.: The Nucleic Acids of the Bacterial Viruses; in: E. Chargaff, J.N. Davidson eds.: The Nucleic Acids, New York - London 1960, Vol. III, p. 187

(81) Spizizen, J.: Infection of Protoplasts by Disrupted T_2 Virus; Proc. Natl. Acad. Sci. 43, 694 (1957)

(82) Stent, G.S.: Superinfection Breakdown; in: F.M. Burnet, W.M. Stanley eds.: The Viruses, New York - London 1959, Vol. 2, p. 269

(83) Stent, G.S.: Molecular Biology of Bacterial Viruses; San Francisco and London 1963

(84) Stewart, S.E.: Neoplastic Disease: Tumor-Virus-Relations; Annual Review Med. 12, 185 (1961)

(85) Streisinger, G., V. Bruce: Linkage of Genetic Markers in Phages T_2 and T_4; Genetics 45, 1289 (1960)

(86) Streisinger, G.: persönl. Mitteilung an C. Bresch 1961, zitiert nach (9)

(87) Streisinger, G., R.S. Edgar, V. Bruce: in Vorbereitung, zitiert nach (88)

(88) Thomas, C.A., I. Rubenstein: The Arrangement of Nucleotide Sequences in T_2 and T_5 Bacteriophage DNA Molecules; Genetics Today, Proc. XI. Int. Congr. Gen. The Hague 1963, Vol. I, Nr. 3.13. p. 23 - Biophys. J. 4, 93 (1964)

(89) Tomizawa, J., S. Sunakawa: The Effect of Chloramphenicol on Deoxyribonucleic Acid Synthesis and the Development of Resistance to Ultraviolet Irradiation in E. coli Infected with Bacteriophage T_2; J. Gen. Physiol. 39, 553 (1956)

(90) Veldhuisen, G., H.S. Jansz, J.B.T. Aten, P.H. Pouwels, R.A. Oosterbaan, J.A. Cohen: Bacteriophage Transformation: Biological Activity of Fragments of DNA of Bacterophage T_4; Biochim. Biophys. Acta 61, 630 (1962)

(91) Veldhuisen, G., R.A. Oosterbaan, P.H. Pouwels, H.S. Jansz, J.A. Cohen: Bacteriophage Transformation; in: Genetics Today, Proc. XI. Int. Congr. Gen., The Hague, Netherl. 1963, Vol. I Nr. 3.29. p. 28

(92) Veldhuisen, G.: persönliche mündliche Mitteilungen, September 1963

(93) Visconti, N., M. Delbrück: The Mechanism of Genetic Recombination in Phage; Genetics 38, 5 (1953)

(94) Wahl, R., J. Huppert, L. Emerique-Blum: Production de phages par des "protoplastes" bactériens infectés par des préparations d'acide désoxyribonucléique; Comptes Rendus Acad. Sciences 250, 4227 (1960)

Lebenslauf

Am 20. Juli 1938 wurde ich, Helmut Zander, in Solingen geboren. Meine Eltern sind der Heimarbeiter Erich Karl Gustav Zander und seine Ehefrau Hedwig Zander geborene Rosenkaymer, beide aus Solingen.

Volksschule und Höhere Schule besuchte ich in Solingen, wo ich Ostern 1958 am " Gymnasium Schwertstrasse " die Reifeprüfung ablegte.

Ich studierte 15 Semester Medizin, Genetik und Biochemie an den medizinischen und naturwissenschaftlichen Fakultäten in Marburg an der Lahn (1958-59), Köln (1959-61) und München (1961-66). Seit dem 3. Semester wurde ich von der Studienstiftung des Deutschen Volkes und seit dem 14. Semester von der Stiftung Volkswagenwerk gefördert.

Das Vorphysikum bestand ich nach dem 2. Semester im April 1959 in Marburg, das Physikum nach dem 5. Semester im Oktober 1960 in Köln und das medizinische Staatsexamen nach dem 13. Semester im Februar 1965 in München, jeweils mit der Note "sehr gut". Meine Famulaturen habe ich in Köln, Granada, Athen und München abgeleistet.

In Köln wirkte ich als Referent der Auslandskommission des Allgemeinen Studentenausschusses und als Fakultätssprecher in der Studentischen Selbstverwaltung mit.

Von Mai 1961 bis Januar 1964 arbeitete ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in München als Doktorand bei Prof. Dr. A. Butenandt unter der Anleitung des heutigen Privatdozenten Dr. P.H. Hofschneider auf dem Gebiet der molekularen Virusgenetik.

Nach dem medizinischen Staatsexamen ergänzte ich in einem zweisemestrigen naturwissenschaftlichen Zweitstudium in München meine biochemischen und genetischen Kenntnisse,

unter anderem nahm ich an einem einsemestrigen biochemischen Praktikum bei Prof. Dr. F. Lynen teil.

Zur Zeit stehe ich in der vorgeschriebenen klinischen Medizinalassistentenausbildung. Nach der ärztlichen Approbation möchte ich mich der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung zuwenden.